



TU Clausthal

**Entwicklung, Modellierung und Validierung
von integrierten kontinuierlichen
Gegenstrom-Chromatographie-Prozessen**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Ingenieurwissenschaften (Dr.-Ing.)

vorgelegt von

Dipl.-Ing. Steffen Zobel-Roos

aus Quakenbrück

genehmigt von der Fakultät für Mathematik/Informatik und
Maschinenbau der Technischen Universität Clausthal

Tag der mündlichen Prüfung

01.06.2018

Vorsitzender der Prüfungskommission:

Prof. Dr. rer. nat. Alfred Weber

Institut für Mechanische Verfahrenstechnik

Technische Universität Clausthal

Betreuer:

Prof. Dr.-Ing. Jochen Strube

Institut für Thermische Verfahrenstechnik und Prozesstechnik

Technische Universität Clausthal

Gutachter:

Prof. Dr. Christian Siemers

Institut für Informatik

Technische Universität Clausthal

Weiterer Gutachter:

Prof. Dr. Massimo Morbidelli

Institut für Chemie- und Bioingenieurwissenschaften

ETH Zürich

Danksagung

Die vorliegende Arbeit ist während meiner Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Thermische Verfahrens- und Prozesstechnik (ITVP) der Technischen Universität Clausthal entstanden. Nach Abschluss meiner Dissertation möchte ich nun allen Personen, die mich bei der Durchführung und Fertigstellung meiner Arbeit unterstützt haben, herzlich danken.

Besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr.-Ing. Jochen Strube für die Ermöglichung dieser Arbeit, für die stets konstruktiven Diskussionen und die umfassende und gute Betreuung. Ich danke ihm insbesondere für seinen fachlichen Input, für die mir eingeräumten Freiheiten und das entgegengebrachte Vertrauen.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. rer. nat Alfred Weber für die Übernahme des Vorsitzes der Prüfungskommission sowie Herrn Prof. Dr. Massimo Morbidelli für die Begutachtung dieser Arbeit. Herrn Prof. Dr. Christian Siemers danke ich ebenfalls für die Begutachtung als auch für die Betreuung dieser Arbeit. Besonders hervorheben möchte ich seine Bereitschaft zur interdisziplinären Zusammenarbeit und der daraus resultierenden Betreuung diverser Abschlussarbeiten ohne die Teile dieser Arbeit nicht möglich gewesen wären.

Für die von ihnen geschaffenen wissenschaftlichen Grundlagen und Handwerkszeuge danke ich den vorherigen Doktoranden: Dr. Markus Kaßing, Dr. Christian Borrmann, Dr. Florian Grote, Dr. Jan Pablo Josch, Dr. Simon Both und Dr. Jan Kristoph Eggersgluß. Besonderer Dank gilt hier Dr. Christoph Helling und Dr. Holger Fröhlich für die Einarbeitung in das Themengebiet und die gute Vorarbeit.

Für die gute Zusammenarbeit, das gute Arbeitsklima und die nötige Ablenkung neben dem Arbeitsalltag möchte ich den Kollegen Dr. Iraj Koudous, Dr. Tim Wellsandt, Dr. Jan Schwellenbach, Dr. Petra Kerstin Gronemeyer, Benjamin Stanisch, Holger Thiess, Martin Lucke, Dr. Maximilian Sixt, Axel Schmidt, Leon Klepzig, Martin Kornecki, Maximilian Huter, Lukas Uhlenbrock sowie Mourad Mouellef und Fabian Mestmäcker danken. Den beiden letztgenannten gilt zusätzlicher Dank für ihren Einsatz während ihrer Bachelor- und Masterarbeiten. Dieses gilt weiterhin für Dominik Stein, Volker Recksiek, Christopher Deppe, Thorsten Roth, Justin Böthführ, Johannes Stempin und

Jan Wolters, die alle über ihre Abschlussarbeiten einen Teil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Gleiches gilt für die technischen Mitarbeiter Frank Steinhäuser, Volker Strohmeier, Wolfgang Otto, Thomas Knebel, Roland Mecke und Uwe Halling, welche durch fundiertes Fachwissen, handwerkliches Geschick und großen Arbeitseinsatz die wissenschaftliche Arbeit am Institut überhaupt erst ermöglichen. Vielen Dank dafür.

Für ihre administrativen und organisatorischen Tätigkeiten am Institut möchte ich mich bei Claudia Lacheta bedanken, die noch dazu durch ihre Heiterkeit zu einem guten Arbeitsklima beigetragen hat.

Mein Dank gilt meinen Eltern Manfred und Elisabeth Zobel, dass sie mir diesen Weg ermöglicht haben. Ich danke ihnen sowie meiner Schwester Esther für die Unterstützung auf dem Weg zum Studium und zusätzlich Babara Boesche und Jörg Roos sowie den weiteren Familienmitgliedern bei ihrer Unterstützung während des Studiums.

Ganz besonderer Dank gilt meiner Frau Lillan Roos und Timba für den bedingungslosen Rückhalt, ihr Einfühlungsvermögen und ihre Unterstützung, derer ich mir zu jeder Zeit sicher sein konnte. Sie haben stets den privaten Ausgleich zum beruflichen Alltag geschaffen.

1. Einleitung	1
2. Kontinuierliche Chromatographie	5
2.1 Stand der Technik	5
2.1.1 Grundlagen der Chromatographie	5
2.1.2 Membranchromatographie	9
2.1.3 Kontinuierliche Chromatographie	10
2.2 Verfahrenskonzepte	22
2.2.1 Einsäulen Simulated Moving Bed (1-SMB)	22
2.2.2 Integrated Counter Current Chromatography (iCCC)	25
3. Modellierung und Simulation	31
3.1 Modellierung	31
3.1.1 Stand der Technik und Implementierung für partikuläre Chromatographie	31
3.1.2 Chromatographie-Anlage	38
3.1.3 Membranchromatographie	39
3.2 Modellparameter Bestimmung	44
3.2.1 Axialer Dispersionskoeffizient D_{ax}	45
3.2.2 Lückengrad und Porosität	46
3.2.3 Stofftransportwiderstand	47
3.2.4 Porendiffusion	48
3.2.5 Adsorptionsgleichgewicht	50
3.3 Material und Methoden	56
3.3.1 Laufmittel, Testsubstanzen und Chromatographie-Materialien	56
3.3.2 Anlagen und Apparate	57
3.3.3 Analytik	58
3.3.4 Modellparameter Bestimmung	59
3.3.5 Validierungsversuche	62
3.4 Validierung	63

3.4.1	<i>Fluidodynamik der Chromatographie-Anlagen</i>	63
3.4.2	<i>Ionenaustausch- und Hydrophobe Interaktions Chromatographie-Säulen</i>	65
3.4.3	<i>Normalphasen Chromatographie</i>	72
3.4.4	<i>Membranchromatographie</i>	75
4.	Prozessbetrachtung	81
4.1	Machbarkeitsstudien: 1-SMB als Alternative zur Mehrsäulen SMB	81
4.2	integrated Counter Current Chromatography	85
4.2.1	<i>Simulationsstudien</i>	85
4.2.2	<i>Experimentelle Studien</i>	89
4.2.3	<i>Zusammenfassung und Ausblick</i>	97
4.3	Kontinuierliche Membranchromatographie.....	99
4.3.1	<i>integrated Counter Current Chromatography</i>	99
4.3.2	<i>Sequentielle Chromatographie</i>	101
4.3.3	<i>Zusammenfassung und Ausblick</i>	104
5.	Prozessanalytische Technologie	107
5.1	Inline Concentration Measurement	108
5.1.1	<i>Stand der Technik</i>	108
5.1.2	<i>Spektraldaten basierte inline Konzentrationsmessung</i>	110
5.2	Material und Methoden.....	115
5.2.1	<i>Elutionsmittel, Testsubstanzen und Chromatographie-Säulen</i> ...	115
5.2.2	<i>Anlagen und Apparate</i>	115
5.2.3	<i>Inline Concentrations Measurement</i>	116
5.2.4	<i>Analytische Trennung eines Protein Testgemischs mittels Kationen Austausch Chromatographie mit NNLS- Algorithmus</i>	117
5.2.5	<i>Immunoglobulin G (IgG) Monomer und Dimer Bestimmung mit SIMPLS-Algorithmus</i>	119
5.3	Validierung und Anwendungsbeispiel	121
5.3.1	<i>Analytische Trennung eines Protein Testgemischs mittels Kationen Austausch Chromatographie mit NNLS- Algorithmus</i>	121

5.3.2	<i>Immunoglobulin G (IgG) Monomer und Dimer Bestimmung mit SIMPLS-Algorithmus</i>	125
5.4	Zusammenfassung und Ausblick	129
6.	Zusammenfassung und Ausblick	131
7.	Symbolverzeichnis	135
7.1	Formelzeichen	135
7.2	Griechische Symbole	137
7.3	Abkürzungen	137
8.	Abbildungsverzeichnis	141
9.	Tabellenverzeichnis	145
10.	Literaturverzeichnis	147

1. Einleitung

Die Entwicklung von wirksamen Medikamenten und deren hochreine Herstellung ist ein aufwendiger und teurer Prozess [Grilo 2017, Jornitz 2012]. Um die hohen Kosten für die Forschung und Entwicklung zu amortisieren, lag der Fokus in der Vergangenheit vor allem auf Medikamenten mit großem Absatzmarkt und hohem Gewinnpotential [Hester 2015]. Die Zahl dieser Blockbuster Produkte ist allerdings in den vergangenen Jahren stark rückläufig [Carroll 2009, FDA 2004, Hester 2015, Taylor 2015]. Diese Entwicklung ist auf mehrere Gründe zurückzuführen. Zum einen sinkt mit steigender Anzahl bekannter Wirkmechanismen und daraus resultierender bereits vorhandener Medikamente die Chance, einen neuen Kandidaten zu entdecken [Taylor 2015]. Zum anderen sind die Anforderungen seitens der Zulassungsbehörden an ein neues Produkt in Hinblick auf Produktqualität und Sicherheit gestiegen [FDA 2003, FDA 2004, Riley 2011].

Eine Chance, diesem Problem zu begegnen, ist der im englischen als „stratified medicine“ bezeichnete Ansatz der Verlagerung weg von Blockbuster Produkten für große Bevölkerungsschichten hin zu pharmazeutischen Produkten für kleinere Bevölkerungsgruppen. Diese Personengruppen haben größere Ähnlichkeit, z.B. in Bezug auf Alter und Geschlecht, als es die Zielgruppen von Blockbuster Produkten haben. Dies erlaubt eine bessere Behandlung. Unter anderem kann die Dosis genauer eingestellt werden, was neben besserer Wirkung auch zu geringeren Nebenwirkungen führt [Padmanabhan 2014].

Der gezeigte Ansatz ist allerdings auch mit höheren Kosten für die Entwicklung und auf Grund geringerer Absatzmengen mit höheren spezifischen Herstellungskosten verbunden. Es wird daher eine Kostenreduktion in den Produktionskosten angestrebt. Diese ist auf unterschiedliche Arten zu erreichen [Chemat 2015, Jornitz 2012, Stankiewicz 2015, Strube 2012, Subramanian 2015].

Diese Arbeit befasst sich daher mit der effizienten Herstellung von pharmazeutischen Wirkstoffen, insbesondere biotechnologisch hergestellten monoklonalen Antikörpern (mAb). Diese Gruppe von Medikamenten gehört seit Jahren zu den Top Sellern [Larroche 2016]. Im Jahre 2015 waren sechs

der zehn bzw. vier der fünf umsatzstärksten Produkte Vertreter dieser Klasse [King 2016].

Das Hauptaugenmerk der Arbeit liegt hierbei in der Aufreinigung des Antikörpers und dabei vor allem auf den chromatographischen Trennschritten. Diese sind in den meisten Prozessen zur Herstellung monoklonaler Antikörper zumeist dreimal vertreten. In der Regel sind zusätzlich nur Membranoperationen vertreten, welche vor allem an den Kosten einen geringen Einfluss haben [Chmiel 2011, Sommerfeld 2005, Subramanian 2015].

Wie eingangs beschrieben wurde, verschiebt sich der Trend weg von Large Scale Produktionen hin zu kleineren Produktionsmengen. Dies hebt den Economy of Scale auf, so dass der klassische Prozess für kleine Margen nicht wirtschaftlich ist, obwohl er bei gleichem Wirkstoff für größere Absatzmengen wirtschaftlich betreibbar wäre. Es müssen daher Alternativen gefunden werden.

Für kleinere pharmazeutische Moleküle ebenso wie für Bulk Chemikalien konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, dass der Wechsel von absatzweiser zu kontinuierlicher Produktion neben weiteren Vorteilen auch eine erhebliche Kostenreduktion sowohl für die Kapital- als auch für die Betriebskosten mit sich bringt [Am Ende 2010, Gerogiorgis 2015]. Zu den weiteren Vorteilen gehören ein kleinerer Anlagenfootprint, gleichbleibende Produktqualität sowie bessere Steuer – und Regelbarkeit [Gerogiorgis 2015, Nasr 2017, Sattler 2000, Strube 2000, Subramanian 2015].

Der kontinuierliche Upstream für biotechnologisch hergestellte Produkte ist auf einem technisch ausgereiften Stand und die meisten Probleme hinreichend beseitigt. Es werden bereits einige Produkte im kontinuierlichen Modus produziert. Hier hat sich vor allem die Perfusionstechnik als geeignete Grundoperation hervorgetan [Konstantinov 2006, Pollock 2013, Warikoo 2012].

Für die Aufreinigung ergeben sich allerdings noch einige Probleme. Auf Grund der großen Verbreitung der Chromatographie im Downstream von Biomolekülen wird bei der Umstellung von absatzweisem zu kontinuierlichem Betrieb vor allem auf kontinuierliche Chromatographie abgezielt [Cramer 2011, Subramanian 2015, Zydney 2016]. Aus der konventionellen chemischen

Industrie bekannte Operationen, wie z.B. die Simulated Moving Bed Chromatographie (SMB) [Mazzotti 2006, Rodrigues 2015, Strube 2000] kommen dabei in der Regel nicht in Frage. Die SMB z.B. kann nur eine binäre Trennung erzeugen sowie nicht mit Gradienten betrieben werden [Belcheva 2004]. Daher kommt sie für die Aufreinigung einer Fraktion aus einem komplexen Mehrkomponentengemisch nicht in Frage.

Alternative Aufreinigungsmöglichkeiten, wie z.B. die Wässrige Zweiphasen Extraktion (ATPE) [Eggersgluß 2012, Puthirasigamany 2014] oder die kontinuierliche Präzipitation [Gronemeyer 2015, Hammerschmidt 2014] bieten großes Potential, haben sich aber bisher nur wenig durchsetzen können [Schaber 2011, Subramanian 2015]. Großes Potential haben auch alternative Säulenmaterialien für die Chromatographie, wie z.B. Membranadsorber [Charcosset 1998] oder Fasern [Schwellenbach 2016]. Allerdings ist hier oft die Kapazität ein Problem, dem ebenfalls über kontinuierliche Fahrweise begegnet werden kann.

Diese Arbeit beschäftigt sich daher mit der kontinuierlichen Chromatographie für große Biomoleküle. Betrachtet werden konventionelle Säulenmaterialien als auch Membranadsorber. Letztgenannte haben im Vergleich zur partikulären Chromatographie eher geringe Beladungskapazitäten, erlauben jedoch hohe Flussraten. Dies bietet hohes Potential für kleinvolumige, kontinuierliche Anlagen bei denen geringe Kapazität durch viele, schnelle Zyklen kompensiert werden kann. Gerade für personalisierte Medizin Ansätze mit häufig wechselnden Produkten pro Anlage ist der Einweg Gedanke mit geringem Reinigungsbedarf während des Produktwechsels vorteilhaft [Allison 2014, Shukla 2013, Yavorsky 2012].

Im Kapitel 2.1 werden zunächst bekannte Prozesse, wie die SMB, Multicolumn Countercurrent Solvent Gradient Purification (MCSGP) oder sequentielle Verfahren vorgestellt. Auf Grundlage der SMB werden im Kapitel 2.2 eigene Prozessvarianten entwickelt. Der Fokus liegt hierbei neben den genannten Vorteilen kontinuierlicher Fahrweise auf möglichst geringer Komplexität und einfacher Auslegbarkeit.

Die meisten kontinuierlichen Chromatographieverfahren arbeiten mit zwei bis sechs Chromatographiesäulen. Eine rein experimentelle Auslegung dieser Operationen ist nur mit großem Materialaufwand, besonders in Bezug auf die Feedmenge, zu realisieren. Es wird daher auf Prozesssimulation gesetzt.

In Kapitel 3 werden daher zunächst die verwendeten Modelle vorgestellt. Es folgt die Parameterbestimmung und Validierung dieser Modelle.

Kapitel 4 führt die vorhergehenden Kapitel zusammen. Die vorgestellten Prozessvarianten werden modellbasiert und teilweise experimentell auf ihre Machbarkeit überprüft und mit bekannten Chromatographieverfahren verglichen. Im Fokus steht dabei neben der Ausbeute und Reinheit die Produktivität und der Eluentenverbrauch als Kennfaktoren für ökonomischen Betrieb.

Die Steuerung und Regelung chromatographischer Prozesse stellt nicht nur bei kontinuierlicher Fahrweise einige Herausforderungen bereit. Daher wurde ein Prozess Analyse Technologie (PAT) Ansatz entwickelt, welcher basierend auf UV-Spektren inline die Konzentration und Reinheit des Produktstroms überwacht. Diese Methode wird in Kapitel 5 vorgestellt.

Wie eingangs erwähnt, sind es vor allem Monoklonale Antikörper, welche von besonderer industrieller und pharmazeutischer Relevanz sind. Es wird daher nur vereinzelt auf Testgemische zurückgegriffen. Für den Großteil der Arbeit werden unterschiedliche Fermentationsbrühen verwendet, welche Immunglobulin G (IgG) in unterschiedlichen Konzentrationen als Wertstoff enthalten.

2. Kontinuierliche Chromatographie

2.1 Stand der Technik

2.1.1 Grundlagen der Chromatographie

Bei der Chromatographie handelt es sich grundsätzlich um einen auf Adsorption basierenden Prozess. Die mit einem Trägermedium beförderten Komponenten binden dabei reversibel an eine stationäre, feste Phase. Je nach Art des Trägermediums kann zwischen Flüssig- und Gaschromatographie unterschieden werden, wobei letztere überwiegend nur für analytische Zwecke eingesetzt wird [Jennings 1997, Poole 2012].

Flüssigchromatographie kann sowohl analytisch [Günzler 2010, Pino 2015, Unger 2012] als auch präparativ betrieben werden. Dabei wird weiter nach der Art des Bindungs- bzw. Separationsmechanismus unterschieden. Die wichtigsten Gruppen sind im Folgenden aufgelistet:

- Größenausschluss (Size Exclusion Chromatography: SEC [Amersham 2002b, Determann 1969, Wu 1999])
- Polarität (Normal Phase: NP / Reversed Phase: RP [Agilent Technologies 2016, Unger 1994, Unger 1995])
- Hydrophobe Interaktion (Hydrophobic Interaction Chromatography: HIC [Amersham 1993, Hahn 2003, Jungbauer 2005, Queiroz 2001])
- Ionenaustausch (Ion Exchange Chromatography: IEX [Amersham 2002c, Amersham 2004, Fritz 2008, Weiss 2004, Yamamoto 1988])
- Affinität (z.B.: Protein A [Amersham 2002a, Hage 2006, Hoffmann-Ostenhof 1978, Zachariou 2008])

Die Liste ist entsprechend der allgemein auftretenden Bindungsstärke sortiert. Die Stärke der Bindung ist dabei in der Auflistung von oben nach unten zunehmend [Agilent Technologies 2016, Amersham 2001]. Auf eine detaillierte Beschreibung der einzelnen Phasen wird verzichtet, diese befindet sich in der anhängenden Literatur.

Die Betriebsweise von chromatographischen Prozessen kann weiterhin in isokratische Elution und Gradientenelution unterschieden werden. Bei der isokratischen Elution ändert sich im Verlauf der Trennung die Zusammensetzung des Laufmittels nicht. Die Moleküle binden reversibel an die stationäre Phase und lösen sich selbstständig wieder von dieser. Je nach

Stärke bzw. Dauer der Bindung werden die Moleküle hierdurch unterschiedlich stark zurückgehalten, was letztlich zur Trennung der Komponenten eines Gemischs führt [Unger 1994].

Bei der Gradientenelution ist die Bindung der Komponenten stärker ausgeprägt. Abbildung 1 zeigt schematisch die Bindung von IgG Molekülen [Yadav 2012] an einen Kationenaustauscher. Bei gleichbleibender Zusammensetzung des Trägerfluides tritt keine oder nur eine sehr langsame Ablösung des Proteins von der stationären Phase auf.

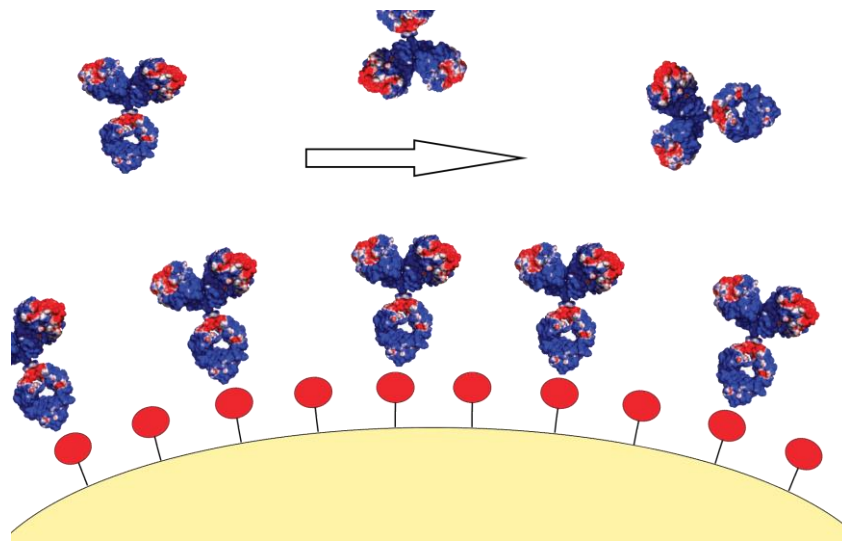


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Bindung von IgG Molekülen [Yadav 2012] an die Oberfläche eines Kationenaustauscher Adsorbens. Die Farben symbolisieren dabei positive (Blau) respektive negative Ladung (Rot).

Die Moleküle müssen aktiv von der stationären Phase abgelöst werden. Dies geschieht über die Änderung der Zusammensetzung der flüssigen Phase. Wie in Abbildung 2 zu erkennen ist, kann dies bei Ionenaustauschern z.B. über die Verdrängung mittels starker Ionen geschehen. Ist die Änderung der Ionenstärke des Laufmittels linear, so spricht man von linearen Gradienten im Gegensatz zum Stufengradienten, wo diese Änderung sprunghaft erfolgt (vgl. Abbildung 3) [Fritz 2008, Unger 1994, Weiss 2004].

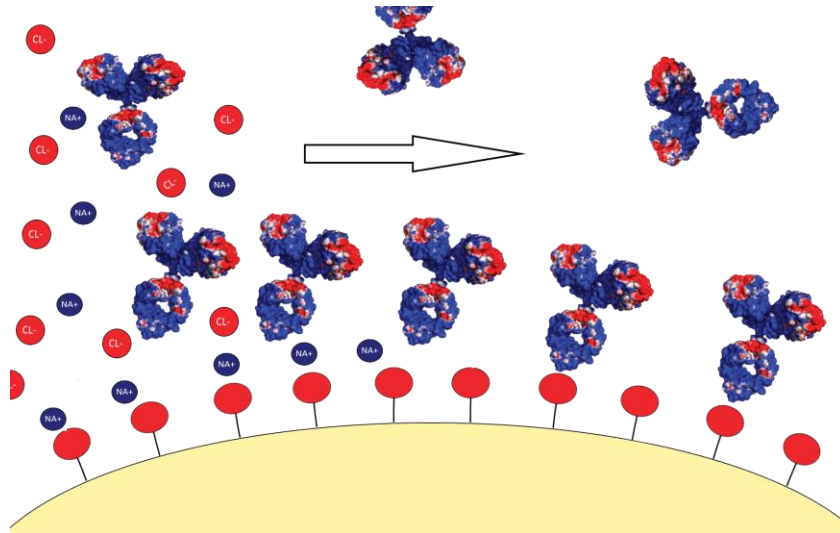


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Verdrängung der IgG Moleküle von den Bindungsstellen mittels stärkerer Bindungspartner, hier Ionen.

Abbildung 3 zeigt den Verlauf der Salzkonzentration bei der Ionenaustauschchromatographie. Zu sehen ist, dass sich die einzelnen Komponenten bei unterschiedlicher Konzentration ablösen und als Peaks (blaue Linie) vom Detektor erkannt werden.

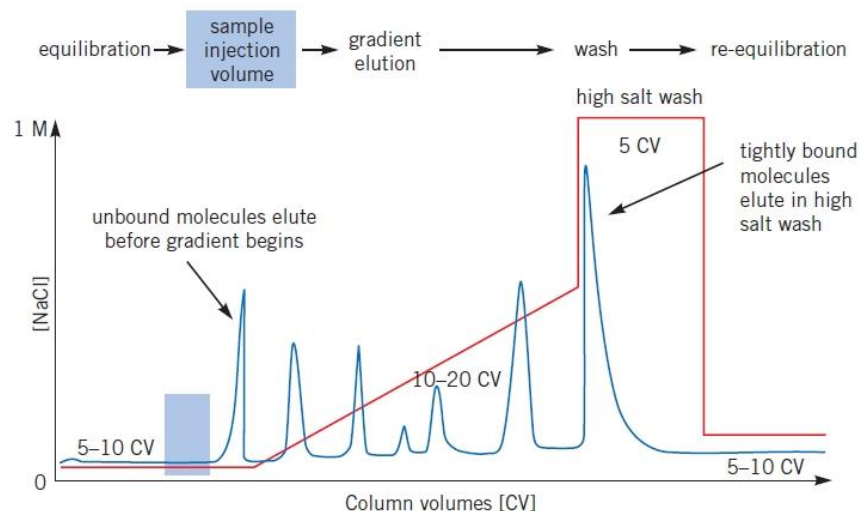


Abbildung 3: Zeitlicher Verlauf der Salzkonzentration (rot) bei einer Gradientenelution mit Sprunganstieg zur Regeneration [Amersham 2004].

Wie stark die Bindung ausgeprägt ist, hängt von den Wechselwirkungen der Zielmoleküle mit der stationären Phase ab. Ebenso, ob eine Änderung der Laufmittelkonzentration zur Elution notwendig ist, oder nicht. Hierbei sind für unterschiedliche stationäre Phasen auch unterschiedliche Gradienten zu benutzen. Eine Beschreibung aller Varianten würde hier zu weit führen. Es sei daher auf weiterführende Literatur verwiesen.

Die Grundlagen der Chromatographie sind hier beschrieben [Agilent Technologies 2016, Unger 1994]. Für chromatographische Trennungen im präparativen Maßstab empfiehlt sich [Guiochon 2006, Schmidt-Traub 2006, Schmidt-Traub 2012, Unger 1995]. Speziell auf die Trennung von Biomolekülen wird hier eingegangen [Amersham 2001, Carta 2010, Chmiel 2011, Scopes 1994].

Für diese Arbeit sind vor allem die Ionenaustausch- und Hydrophobe Interaktionschromatographie von Interesse. Sie finden, neben der Protein A Affinitätschromatographie, in vielen Prozessen zur Herstellung monoklonaler Antikörper Anwendung [Carta 2010, Sommerfeld 2005, Subramanian 2012, Subramanian 2017].

Wie Abbildung 1 und Abbildung 2 verdeutlichen, ist für die Bindung der Substanzen an einen Ionenaustauscher eine Nettoladung der Moleküle notwendig. Gleichzeitig muss die Konzentration stärker geladener Teilchen gering sein. Die Nettoladung von Proteinen ist abhängig vom pH Wert. Bei einem bestimmten pH Wert, dem isoelektrischen Punkt, ist sie null. Bei höheren bzw. niedrigerem pH Wert wird sie negativ bzw. positiv [Bjellqvist 1993, Gauci 2008, Khawli 2010].

Die Beladung der Ionenaustausch Chromatographie erfolgt daher mit einer pH Pufferlösung geringer Salzkonzentration. Die Elution erfolgt wahlweise durch Änderung des pH Wertes oder Erhöhung der Salzkonzentration. Die Art des Salzes, genau der Ionen, welches zur Elution verwendet wird, ist dabei eher zweitrangig. Zumeist findet Natriumchlorid Anwendung [Amersham 2004, Carta 2010].

Bei der hydrophoben Interaktionschromatographie besteht ebenfalls ein starker Zusammenhang zwischen der Bindungsstärke von Proteinen und der Salzkonzentration. Bei niedrigen Salzkonzentrationen richten sich große Moleküle in wässrigen Lösungen so aus, dass die hydrophoben Teile nach Innen zeigen. Die hydrophilen Teile zeigen entsprechend nach außen und sind von einer Hydrathülle umgeben. Diese Hydrathülle kann von kosmotropen Ionen verkleinert bzw. entfernt werden. Man spricht dabei vom „Aussalz Effekt“ [Baldwin 1996, Hofmeister 1888, Hünenberger 2011, Melander 1977].

Im Gegensatz zur Ionenaustausch Chromatographie findet die Beladung bei der Hydrophoben Interaktionschromatographie daher mit einem ca. 0,7 – 1 M

Salzpuffer statt. Die Elution erfolgt durch Absenken der Salzkonzentration. Weiterhin ist hier die Art der Ionen sehr relevant. Dies wurde erstmals von Hofmeister erkannt, welcher viele Salze entsprechend der Effektstärke in der nach ihm benannten „Hofmeister Reihe“ [Hofmeister 1888] sortierte. In der Hydrophoben Interaktionschromatographie wird häufig Ammoniumsulfat benutzt [Amersham 1993, Borrmann 2011].

In vielen Prozessen zur Herstellung von IgG folgt auf eine Ionenaustausch- eine Hydrophobe Interaktionschromatographie [Sommerfeld 2005, Subramanian 2012, Subramanian 2017]. Dazwischen findet in der Regel ein Pufferwechsel statt, da nicht dasselbe Salz im Gradienten genutzt wird. Dieser Pufferwechsel ist ein recht aufwendiger und unnötig kostenintensiver Prozess. Es konnte bereits gezeigt werden, dass es möglich ist, beide Chromatographieschritte mit dem gleichen Puffersalz zu betreiben [Borrmann 2009, Helling 2012, Zhang 2017].

2.1.2 Membranchromatographie

Wird an Stelle von meist runden, porösen Partikeln eine Membran als Untergrund für die Liganden verwendet, so spricht man von Membranadsorption bzw. Membranchromatographie [van Reis 2001]. Der Hauptunterschied zwischen beiden Prozessen ist die Strömungsführung. In der klassischen Chromatographie wird die Säule axial konvektiv durchströmt. Die Wanderungsgeschwindigkeit liegt, abhängig von der stationären Phase, bei ca. 300-500 cm/h. Der Stofftransport innerhalb der Poren ist diffusiv und damit vergleichsweise langsam. Bei Membranadsorbern hingegen werden die Membranschicht und damit die Poren konvektiv, orthogonal zur Membranoberfläche durchströmt. Porendiffusion tritt nicht auf [Ghosh 2002]. Dies ermöglicht hohe Flussgeschwindigkeiten und kurze Prozesszeiten. Aufgrund der relativ geringen Druckstabilität sind jedoch nur wenige Membranlagen realisierbar. Dies hat geringe Betthöhen zur Folge. Der Volumenstrom liegt für Membranadsorber bei bis zu 30 Membranzvolumen pro Minute. Die geringe Betthöhe wirkt sich negativ auf die Anwendbarkeit der Membranchromatographie aus. Es wären zwar theoretisch alle aus der klassischen Chromatographie bekannten Liganden auch auf Membranen realisierbar, eine effektive Trennleistung ist bei geringer Betthöhe allerdings nur für Mechanismen mit hoher Bindungsstärke zu erreichen. Es werden daher vor allem Ionenaustausch-, hydrophobe Interaktions- und

Affinitätsmembranen angeboten [Ghosh 2002, Saxena 2009, Schwellenbach 2017].

Ein großer Nachteil der Membranchromatographie im Vergleich zur Partikelchromatographie sind die geringeren Beladungskapazitäten. Je nach Bindungsmechanismus liegen diese bei ca. 10-30 g mAb /l Membran, im Vergleich zu ca. 30 – 150 g mAb /l Adsorber für partikuläre Chromatographie [Charcosset 2006, Ghosh 2002, Saxena 2009, Schwellenbach 2017].

Der direkte Vergleich zwischen partikulärer und membrangestützter Chromatographie ist schwierig. Dies liegt nicht zuletzt auch an der Verwendung unterschiedlicher Bezugssysteme und dem Fokus auf andere Anwendungsbereiche. Die Betthöhen bei Membranadsorbern liegen häufig unter 1 cm, bei klassischer Chromatographie meist über 10 cm, wobei längere Trennstrecken in der Regel zu besseren Trennleistungen führen. Bezogen auf gleiches Bettvolumen und unter der Annahme der gerade genannten Betthöhen ließen sich mit Membranadsorbern ca. 35-fach höhere Volumenströme erreichen. Gleichzeitig wäre die Bindungskapazität jedoch ca. 15-mal geringer. Die Produktivität wäre damit für Membranadsorber höher. Ob die gewünschte Reinheit jedoch erreicht wird und für den geplanten Prozess Membranadsorber in der entsprechenden Größe bzw. Kapazität vorhanden sind, muss jedoch ebenfalls berücksichtigt werden.

2.1.3 Kontinuierliche Chromatographie

2.1.3.1 *Simulated Moving Bed (SMB)*

Grundsätzlich handelt es sich bei der klassischen Säulenchromatographie um einen Batch Prozess. Das Grundproblem wird in Abbildung 4 veranschaulicht. Für die nachfolgenden Ausführungen wird isokratische Fahrweise angenommen.

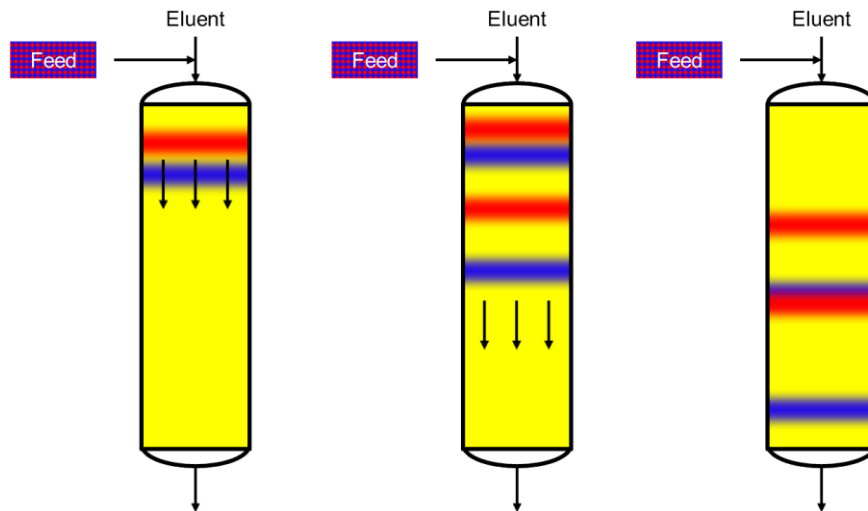


Abbildung 4: Schematische Darstellung mehrerer Injektionen auf eine Chromatographiesäule. Die schneller wandernde Komponente (blau) holt die langsamere (rot) ein.

Wie in Abbildung 4 zu erkennen ist, kann eine einzelne Chromatographiesäule nicht kontinuierlich beladen werden. Es käme zu einer Vermischung der schneller wandernden Komponenten der zweiten Injektion mit den langsamer wandernden Komponenten der ersten Injektion und damit zu keiner Trennung.

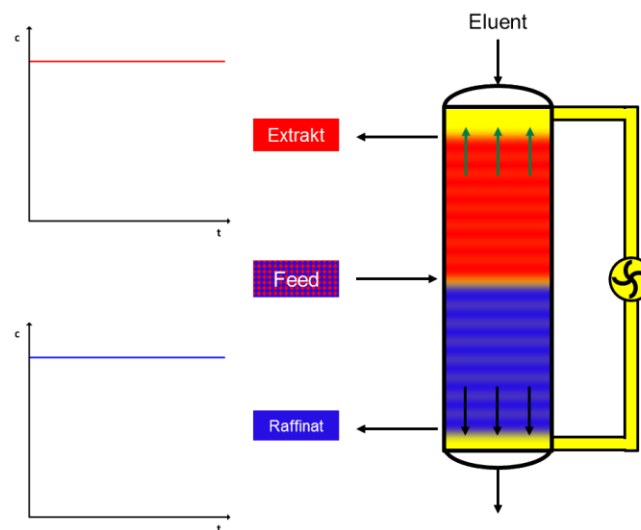


Abbildung 5: True Moving Bed Prozess. Die Bewegung der festen Phase (grüne Pfeile) läuft im Gegenstrom zur der flüssigen Phase (schwarze Pfeile).

Eine kontinuierliche Trennung zu erreichen gelingt über die Förderung der stationären Phase im Gegenstrom zu der flüssigen Phase. Dieser in Abbildung 5 dargestellte Prozess wird als True Moving Bed bezeichnet. Dabei muss die Geschwindigkeit der festen Phase auf die Wanderungsgeschwindigkeit der Komponenten durch die feste Phase abgestimmt werden [Migliorini 2000,

Storti 1993]. Sie muss zwischen der Geschwindigkeit der schnellen und der langsamen Komponente liegen. So wird bei gleicher Relativgeschwindigkeit die absolute Wanderungsgeschwindigkeit der schnelleren Komponente verlangsamt. Die langsamer wandernde Komponente wird entgegen ihrer eigentlichen Fließrichtung mitgefördert [Deckert 1994, Migliorini 2000, Storti 1993].

Eine Förderung der stationären Phase ist allerdings aus diversen Gründen problematisch. Zum einen ist das Material sehr abrasiv, was zu hohem Materialaufwand oder Verschleiß bei Pumpen, Ventilen und Rohrleitungen führt. Zum anderen ist das Erreichen einer hohen Packungsgüte schwer realisierbar [Deckert 1994, Rodrigues 2015, Strube 1996].

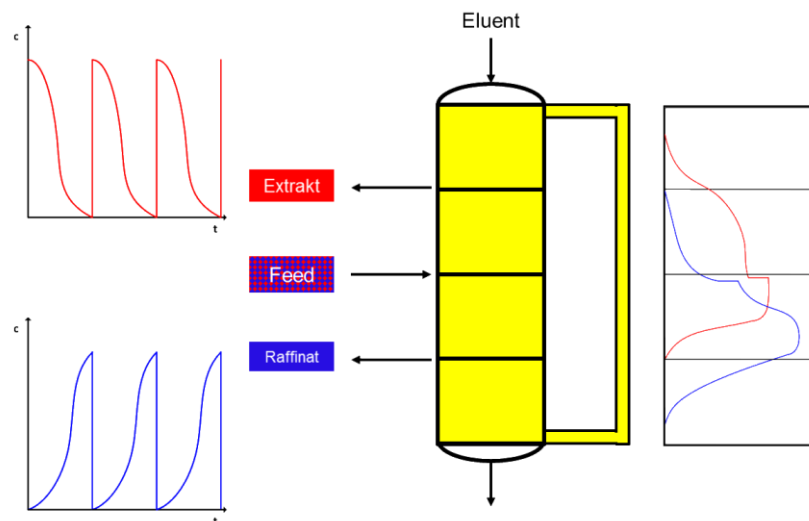


Abbildung 6: Simulated Moving Bed Prozess.

Der Simulated Moving Bed (SMB) Prozess begegnet den genannten Problemen durch einen periodischen Gegenstrom anstelle eines Kontinuierlichen. Dies wird durch die Benutzung mehrerer Säulen erreicht. Wie in Abbildung 6 zu erkennen ist, wird das benötigte Adsorptionsbed auf mehrere Säulen aufgeteilt. Diese werden zeitgleich nach Verstreichen der Schaltzeit t_{schalt} entgegen der Flussrichtung des Eluenten befördert. Dies geschieht in der Regel über eine Weiterschaltung der Zu- und Ablaufströme über Ventilschaltungen [Deckert 1994, Faria 2015, Rodrigues 2015, Strube 1996]. Diese Fahrweise wurde erstmals von Universal Oil Products angewendet [Broughton 1961].

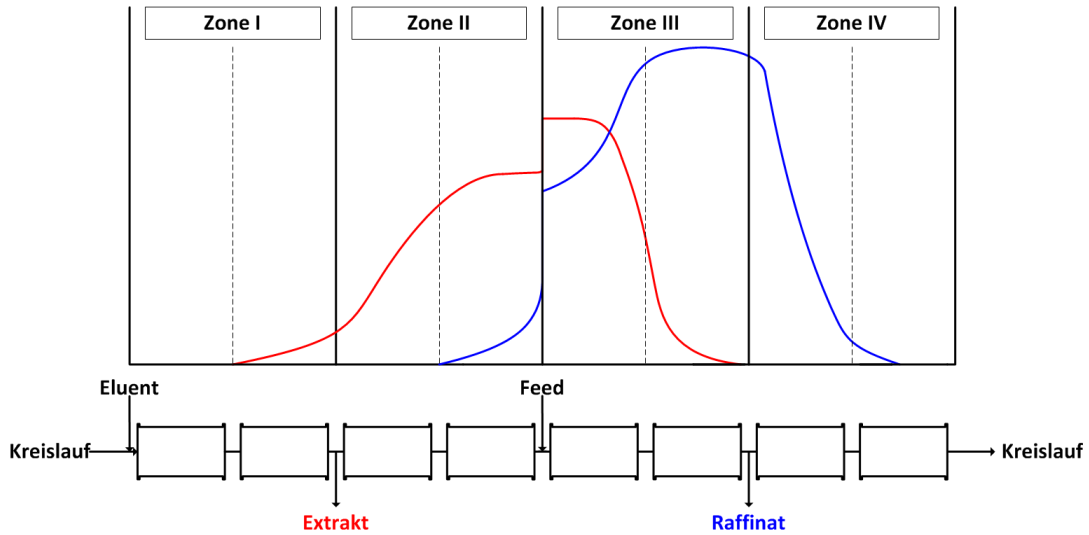


Abbildung 7: Kolonnenprofile einer acht Säulen SMB am Zyklusende.

Wie in Abbildung 6 zu erkennen ist, entstehen durch die Positionen der Zu- bzw. Ablaufströme vier Zonen. Diese sind in Abbildung 7 dargestellt. Gezeigt ist dabei das Ende eines Zyklus einer acht Säulen SMB, kurz vor der Weiterschaltung aller Ströme (nach rechts). Wie auch beim True Moving Bed Prozess muss die Geschwindigkeit der festen Phase an die Wanderungsgeschwindigkeit der Komponenten angepasst werden. Der Volumenstrom der festen Phase \dot{V}_B entspricht dabei dem Quotienten aus Bettvolumen V_B und Schaltzeit t_{schalt} [Mazzotti 1997a]:

$$\dot{V}_B = \frac{V_B}{t_{\text{schalt}}} = \frac{V_{\text{Säule}} \cdot \varepsilon_t}{t_{\text{schalt}}} \quad (1)$$

Mit $V_{\text{Säule}}$ als Säulenvolumen und ε_t als totale Porosität. Die Schaltzeit t_{schalt} und damit der Volumenstrom der festen Phase sind in allen Zonen gleich. Lediglich der Volumenstrom der flüssigen Phase $\dot{V}_{L,j}$ innerhalb der Säulen ist unterschiedlich. Dieser kann jedoch nicht direkt eingestellt werden. Er wird jeweils über die Zulaufströme Kreislauf, Eluent und Feed sowie die Ablaufströme Extrakt und Raffinat geregelt. Es gelten dabei folgende Beziehungen:

$$\dot{V}_{L,I} = \dot{V}_{\text{Kreislauf}} + \dot{V}_{\text{Eluent}} \quad (2)$$

$$\dot{V}_{L,II} = \dot{V}_{f,I} - \dot{V}_{\text{Extrakt}} \quad (3)$$

$$\dot{V}_{L,III} = \dot{V}_{f,II} + \dot{V}_{\text{Feed}} \quad (4)$$

$$\dot{V}_{L,IV} = \dot{V}_{f,III} - \dot{V}_{\text{Raffinat}} \quad (5)$$

Betrachtet man erneut Abbildung 7, so lässt sich feststellen, dass einige Bedingungen erfüllt sein müssen, um hohe Reinheiten zu erzielen. So muss vor Erreichen der Schaltzeit:

- das Extrakt komplett aus der ersten Säule von Zone I sowie
- das Raffinat komplett aus der ersten Säule von Zone II verdrängt werden.
- Die Adsorptionsfront des Extrakts in der zweiten Säule von Zone III sowie
- die Adsorptionsfront des Raffinats in der zweiten Säule von Zone IV gehalten werden.

Diese Bedingungen können über die Anpassung der Volumenströme in den einzelnen Zonen erreicht werden. Wie die Formeln (1) bis (5) jedoch zeigen, ist es nicht möglich, einzelne Volumenströme oder die Schaltzeit unabhängig von den anderen Parametern zu optimieren. Aus diesem Grund wird bei der Auslegung der SMB in der Regel der Volumenstrom der flüssigen Phase einer Zone ins Verhältnis zum Volumenstrom der festen Phase gesetzt. Letzterer enthält die Schaltzeit. Die grundlegenden Ideen der folgenden Auslegungsmethodik gehen dabei zurück auf Rhee et al. [Rhee 1971]. Die Theorie geht hierbei von stetigem Gleichgewicht aus, weshalb auch von Gleichgewichtstheorie gesprochen wird. Bezugnehmend auf das resultierende Diagramm (vgl. Abbildung 8) spricht man auch von Dreieckstheorie [Mazzotti 2006, Rodrigues 2015].

Nach Formel (6) errechnet sich das Massenstromverhältnis m_j der Zone j gemäß [Mazzotti 1997a]:

$$m_j = \frac{\dot{V}_{L,j} \cdot t_{\text{schalt}} - V_{\text{Säule}} \cdot \varepsilon_t}{V_{\text{Säule}} \cdot (1 - \varepsilon_t)} \quad (6)$$

Unter Berücksichtigung der theoretischen Verweilzeit einer Komponente t_{th} gemäß Formel (7) [Guiochon 2006]:

$$t_{th,i} = t_0 \cdot \left(1 + \frac{1 - \varepsilon_t}{\varepsilon_t} \cdot \left. \frac{dq_i}{dc_i} \right|_{\bar{c}} \right) \quad (7)$$

lässt sich eine einfache Beziehung zwischen den Isothermen, genauer den Henry Koeffizienten H_i , der einzelnen Komponenten und dem Massenstromverhältnis herleiten. Es gilt [Guiochon 2006, Rodrigues 2015]:

$$H_i = \frac{dq_i}{dc_i} \quad (8)$$

Setzt man Formel (8) in Formel (7) ein und stellt nach H_i um, so ergibt sich Formel (9) zu:

$$H_i = \frac{\frac{t_{th,i}}{t_0} \cdot \varepsilon_t - \varepsilon_t}{1 - \varepsilon_t} \quad (9)$$

Wird dieses mit dem Säulenvolumen erweitert, erhält man:

$$H_i = \frac{\frac{V_{Säule} \cdot \varepsilon_t}{t_0} \cdot t_{th,i} - V_{Säule} \cdot \varepsilon_t}{V_{Säule} \cdot (1 - \varepsilon_t)} \quad (10)$$

Unter Berücksichtigung von Formel (1) wird der Zusammenhang zwischen den Henry-Koeffizienten und den Massenflussverhältnissen sichtbar. Damit lässt sich für eine Trennung zweier Komponenten 1 und 2 ein Satz von Ungleichungen aufstellen, unter deren Einhaltung die oben genannten Bedingungen zum Erreichen von hohen Reinheiten erfüllt werden [Mazzotti 1997a]:

$$H_2 < m_1 < \infty \quad (11)$$

$$H_1 < m_2 < H_2 \quad (12)$$

$$H_1 < m_3 < H_2 \quad (13)$$

$$\frac{-\varepsilon_{p,i}}{(1 - \varepsilon_{p,i})} < m_4 < H_1 \quad (14)$$

Der Index i der Komponenten wird entsprechend der Retentionszeit aufsteigend vergeben. Komponente 1 ist die schwach bindende, Komponente 2 die stärker bindende Komponente. Diese Ungleichungen lassen sich auch in einem Dreiecksdiagramm darstellen (vgl. Abbildung 8) [Storti 1989]. Dazu werden die Massenflussverhältnisse m_2 bzw. m_3 auf der x- bzw. y-Achse aufgetragen:

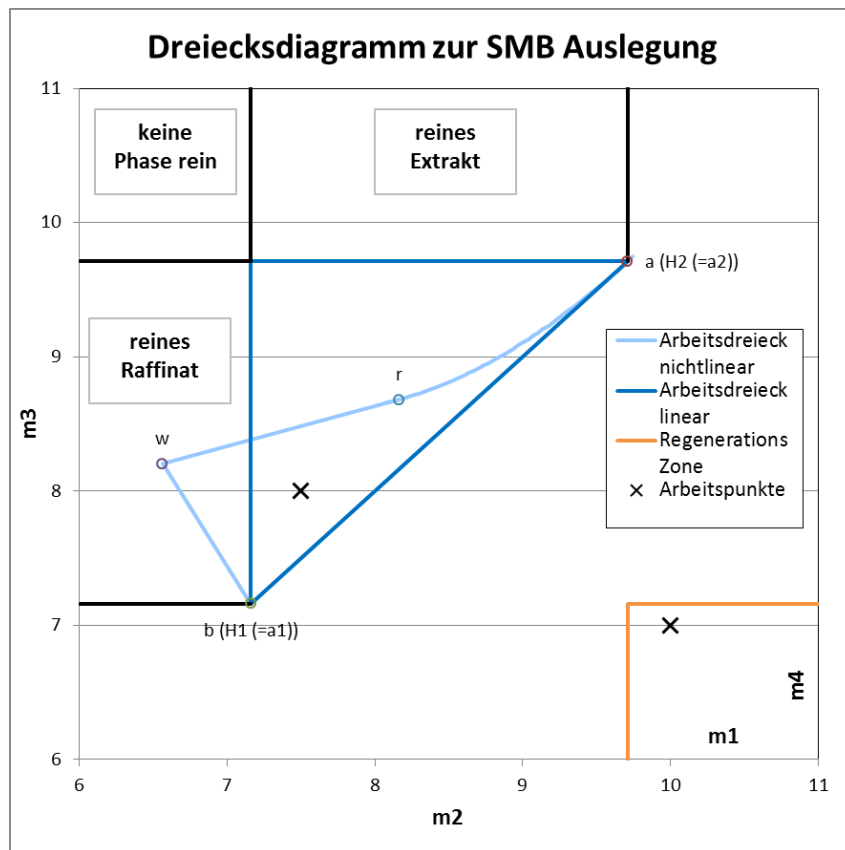


Abbildung 8: Dreiecksdiagramm für ein Zweikomponenten Gemisch.

Alle zuvor genannten Bedingungen und Einschränkungen gelten für lineare Isothermen. Für diesen Fall ergibt sich im Arbeitsdiagramm ein rechtwinkliges Dreieck (dunkelblau) mit den Henry-Koeffizienten der einzelnen Komponenten als Eckpunkte. Diese sind in Abbildung 8 mit a bzw. b bezeichnet. Werden die Parameter m_2 und m_3 so gewählt, dass der Arbeitspunkt innerhalb des Dreiecks liegt, werden sowohl das Extrakt als auch das Raffinat mit 100% Ausbeute und Reinheit erhalten [Mazzotti 1997a, Mazzotti 2006, Strube 2000]. Dieses Dreieck entspricht den Ungleichungen (12) und (13). Außerhalb des Dreiecks, allerdings oberhalb der Winkelhalbierenden, kann entweder nur reines Raffinat, nur reines Extrakt oder keine reine Phase gewonnen werden. Ähnliche Dreiecke lassen sich auch für geringere Reinheitsanforderungen konstruieren [Kaspereit 2007, Rajendran 2008]. Ein Arbeitspunkt für m_2/m_3 unterhalb der Winkelhalbierenden ist nicht möglich. Dazu müsste der Feedstrom negativ sein. Abbildung 8 zeigt in orange weiterhin den Bereich, in dem für m_1/m_4 die Randbedingungen (11) und (14) erfüllt werden. Dieses Dreieck kennzeichnet den Regenerationsbereich. Für Langmuir-Isothermen ist der Grenzfall für m_4 entgegen der Ungleichung (14) nicht die Henry-Koeffiziente der stärker bindenden Komponente H_2 sondern [Mazzotti 2006]:

$$m_{4,max} = \frac{1}{2} \cdot \left\{ m_3 + H_1 + K_1 c_i (m_3 - m_2) - \sqrt{[m_3 + H_1 + K_1 c_i (m_3 - m_2)]^2 - 4m_3 H_3} \right\} \quad (15)$$

Für nichtlineare Isothermen ändert sich die Form des Dreiecks in Abhängigkeit von der Feedkonzentration $c_{Feed,i}$. Die Art der Isotherme entscheidet dabei über die Lage der Punkte w und r. Die Herleitungen hierzu finden sich bei Storti et al. [Storti 1989, Storti 1993, Storti 1995] bzw. Mazzotti et al. [Mazzotti 1994, Mazzotti 1996, Mazzotti 1997a, Mazzotti 1997b] und wurden von Letzterem zusammengefasst [Mazzotti 2006].

In dieser Arbeit werden nur Langmuir-Isothermen betrachtet. Die hierfür geltenden Gleichungen sind Mazzotti et al. [Mazzotti 2006] entnommen und in Tabelle 1 zusammengefasst:

Tabelle 1: Gleichungen für die charakteristischen Punkte im Dreiecksdiagramm:

Punkt	m2	m3
a	H_2	H_2
b	H_1	H_1
r	$\frac{\omega_2^2}{H_2}$	$\frac{\omega_2 \cdot [\omega_2 \cdot (H_1 - \omega_1) + \omega_1 \cdot (H_2 - H_1)]}{H_1 \cdot (H_2 - \omega_1)}$
w	$\frac{\omega_2 \cdot H_1}{H_2}$	$\frac{\omega_2 \cdot [H_1 \cdot (H_1 - \omega_1) + \omega_1 \cdot (H_2 - H_1)]}{H_1 \cdot (H_2 - \omega_1)}$

Dabei entspricht ω_i dem Massenanteil der Komponente i berechnet ohne das Lösemittel (Formel (16)) [Mazzotti 2006]:

$$\omega_i = \frac{c_{Feed,i}}{c_t} \quad (16)$$

Mit $c_{Feed,i}$ als Feedkonzentration der Komponente i und c_t als Feed Gesamtkonzentration.

Die hier gezeigten Auslegungsprinzipien gelten mit kleinen Anpassungen ebenso für den True Moving Bed Prozess [Mazzotti 1994, Mazzotti 1996, Ruthven 1989].

Zu beachten ist weiterhin, dass die Gleichgewichtstheorie diverse Vereinfachungen enthält. Stofftransportphänomene, wie zum Beispiel die häufig geschwindigkeitsbestimmende Porendiffusion, werden vernachlässigt. Deshalb hat sich schon früh die Prozesssimulation als weiteres Auslegungswerkzeug durchgesetzt [Morbideilli 1982, Pais 1998, Strube 1996, Strube 1997, Strube 2000].

Bei der bisher vorgestellten Simulated Moving Bed Variante handelt es sich um das vier Zonen Closed Loop Konzept. Hierbei wird, wie in Abbildung 7 gezeigt wird, der Eluent vom Ende der Zone IV auf die Zone I rezykliert. Daneben gibt es auch noch eine offene Variante ohne vierte Zone [Song 2012, Song 2013].

Beide Varianten können jedoch nur einen binären Split erzeugen und sind somit für die Gewinnung einer Mittelfraktion aus einem Mehrkomponentengemisch nicht geeignet. Dieses Problem kann wahlweise über die Verschaltung zweier SMB oder die Kombination zu einer acht Zonen SMB gelöst werden [Kiwala 2016, Ribeiro 2016, Santos da Silva 2016].

Da es nur zwei Einlaufports gibt, der Prozess jedoch vollkontinuierlich durchläuft, ist es kaum möglich, einen Gradienten zu fahren. Lediglich ein Stufengradient mit der Stufe zwischen Zone II und III ist möglich [Abel 2004, Belcheva 2004].

Die Vorteile der SMB liegen, neben dem kontinuierlichen Betrieb, hoher Ausbeute und Reinheit vor allem in sehr hoher Produktivität und, zumindest im Closed Loop Betrieb, sehr geringem Lösemittelverbrauch.

2.1.3.2 *Multicolumn Countercurrent Solvent Gradient Purification (MCSGP)*

Die Multicolumn Countercurrent Solvent Gradient Purification im sechs Säulen Setup, wie es in Abbildung 9 zu sehen ist, stellt eine konsequente Weiterentwicklung des SMB Konzepts dar. Von den sechs Säulen werden jeweils drei miteinander verbunden betrieben. Das Eluat wird jeweils an die nachfolgende Säule weitergeleitet. Die anderen drei Säulen eluieren einzeln Starkbinder, Produkt oder Schwachbinder. Die Säulen werden dabei gemäß dem Schaubild nach links weitergeschaltet und durchlaufen damit nacheinander die Stufen: Beladung, Recycling, Elution, Recycling, Waschen,

Equilibrieren [Aumann 2007a, Aumann 2007b, ChromaCon AG, Ströhlein 2006].

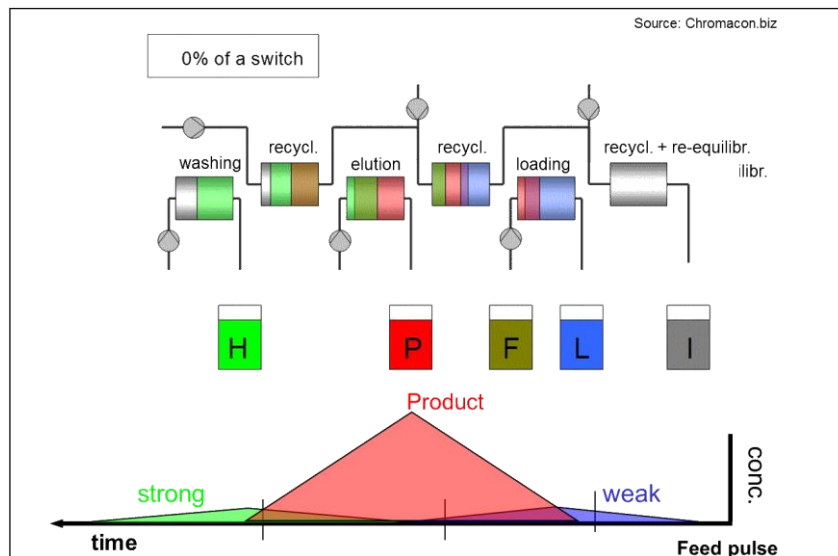


Abbildung 9: Multicolumn Countercurrent Solvent Gradient Purification (MCSGP) [Müller-Späth 2014].

Durch die insgesamt sechs Zuläufe können, im Gegensatz zur SMB, unterschiedliche Elutionsstärken eingestellt werden. Damit, und in Kombination mit der Säulenschaltung, wird es ermöglicht, eine Gradientenelution durchzuführen und bei Erreichen einer bestimmten Reinheit, das Produkt gezielt abzuziehen. Noch unreines Produkt geht nicht verloren, sondern verbleibt im System [Aumann 2007a, Ströhlein 2006].

Auf Grund der Komplexität findet dieses Setup wenig Anwendung. Eine Weiterentwicklung arbeitet daher mit nur drei Säulen, welche zwischen dem Sequentiellen- und Einzelbetrieb hin und her schalten. Damit ist die gleiche Trenngüte erreichbar, allerdings nur semikontinuierlich [Aumann 2008].

Eine weitere Vereinfachung stellt das Twincolumn Konzept dar. Hierbei werden nur zwei Säulen betrieben. Wie in Abbildung 10 dargestellt ist, wird eine Säule wie im Batch Modus beladen und eluiert. Das Produkt wird dabei mit hoher Reinheit fraktioniert (B1). Die Überlappungsbereiche von Produkt mit Schwachbinder (W/P Fraktion) sowie Produkt und Starkbinder (P/S Fraktion) werden ebenfalls fraktioniert und nach entsprechender Verdünnung auf die zweite Säule geladen. Diese Verdünnung ist notwendig, um die Elutionsstärke des Laufmittels zu verringern und so überhaupt eine Bindung zu ermöglichen. Anschließend wird die zweite Säule beladen und Säule eins fängt die Mischfraktionen auf [Krättli 2011, Krättli 2013].

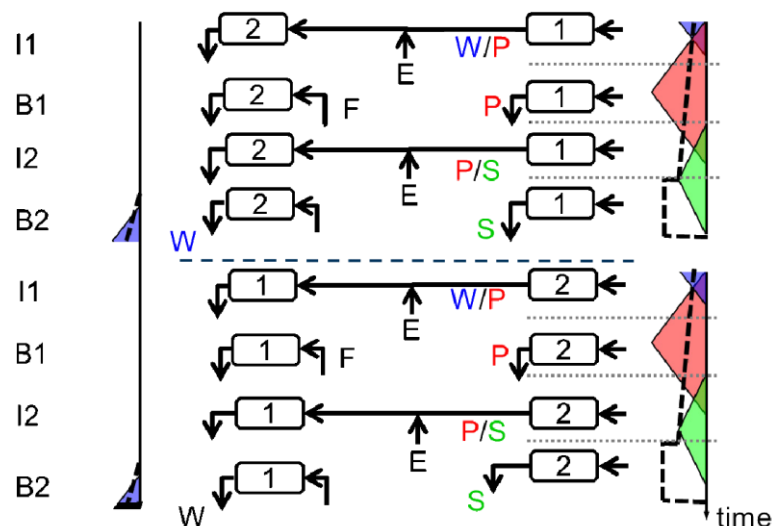


Abbildung 10: Taktschema einer Twincolumn MCSGP [Krättli 2013].

Diese Fahrweise ermöglicht neben hohen Reinheiten auch hohe Ausbeuten. Es konnte gezeigt werden, dass unter bestimmten Umständen eine Steigerung der Ausbeute im Vergleich zum Batch Prozess um das Vierfache möglich ist [Steinebach 2016].

2.1.3.3 Sequentielle Chromatographie

Eine Sonderstellung innerhalb der kontinuierlichen Chromatographieverfahren nimmt die sequentielle Chromatographie ein. Abbildung 11 verdeutlicht das allgemeine Prinzip. Zu Beginn eines Zyklus sind hierbei mindestens zwei Säulen in Reihe geschaltet. Die erste Säule wird nun nicht, wie in der Batch Chromatographie üblich, bis zum Durchbruch der Zielkomponente beladen, sondern darüber hinaus. Das nicht gebundene Feed fließt auf die zweite Säule und geht nicht verloren. Ist die Beladung der ersten Säule abgeschlossen, wird sie aus der Sequenz ausgeschaltet. Der Feed Zulauf wechselt auf die nächste Säule. Die ausgekoppelte Säule durchläuft eine normale Batch Elution. Anschließend wird sie regeneriert am Ende der Sequenz wieder in die Reihe aufgenommen [Angelo 2018, Godawat 2012, Holzer 2008, Novasep, Whitford 2010].

Es handelt sich hierbei also um kontinuierliche Feedbeladung, allerdings um diskontinuierliche Produktgewinnung. Eine Ausnahme bildet die BioSMB von Pall (ehemals Tarpon). Wird sie mit genügend Säulen betrieben, kann zu jeder Zeit in jedem Elutionsschritt eine Säule vorhanden sein. Dies ermöglicht auch kontinuierlichen Produktstrom [Gjoka 2015, Subramanian 2015, Whitford 2010].

Bisher wurde für die sequentielle Fahrweise keine signifikanten Verbesserungen der Ausbeuten oder Reinheiten festgestellt. Vorteilhaft sind die Steigerung der Adsorbensausnutzung sowie die Verkleinerung der Anlagengröße. Anstatt möglichst viel Feed in wenigen Beladungen (ideal einer) zu verarbeiten, wird das Volumen über einen längeren Zeitraum prozessiert. Damit kann eine große durch mehrere, deutlich kleinere Säulen ersetzt werden [Subramanian 2015].

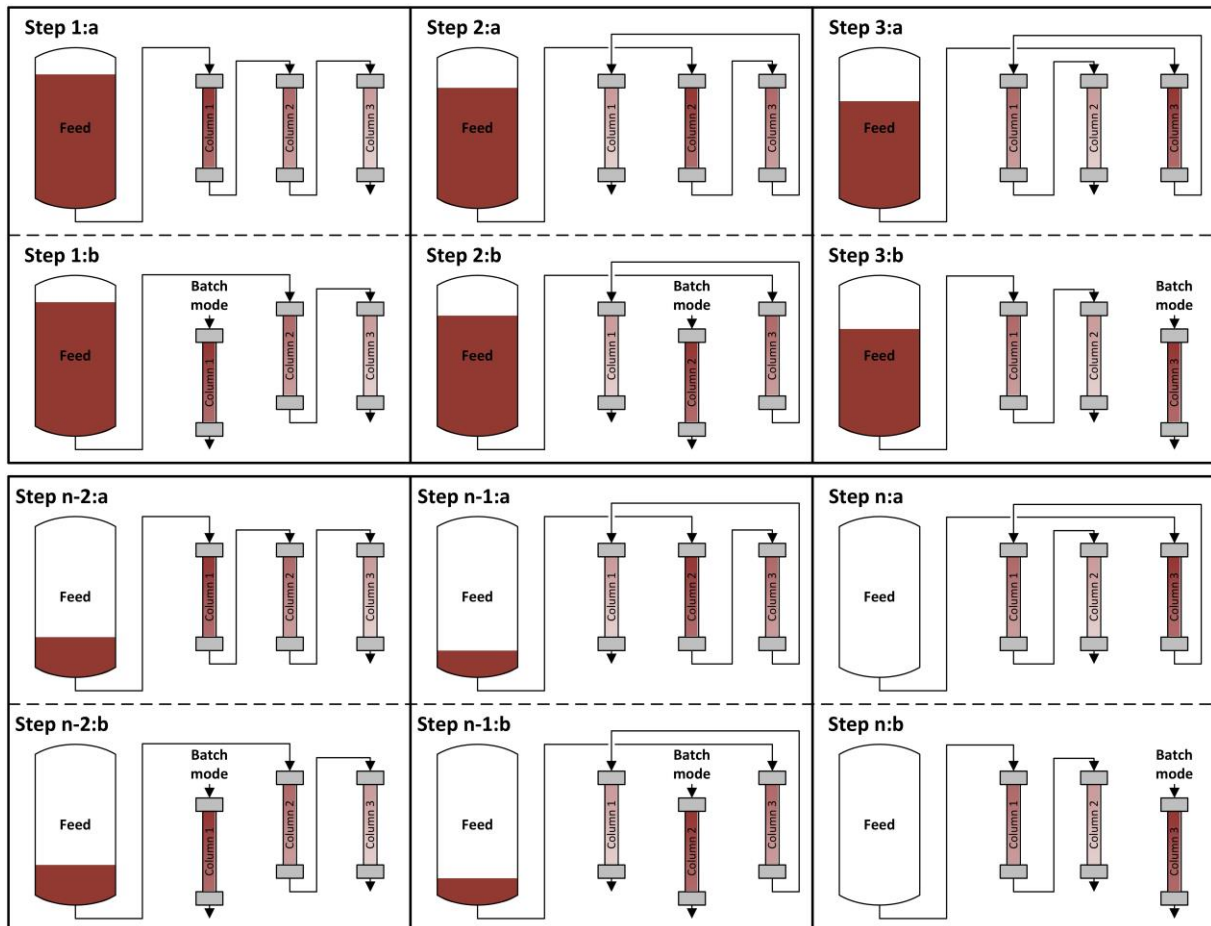


Abbildung 11: Schematische Darstellung einer sequentiellen Chromatographie Verschaltung.

2.2 Verfahrenskonzepte

2.2.1 Einsäulen Simulated Moving Bed (1-SMB)

Einer der Hauptvorteile der SMB ist, neben der kontinuierlichen Fahrweise, die hohe Ausbeute und Reinheit beider gewonnenen Phasen. Dabei ist keine Basislinientrennung notwendig. Dies wird dadurch erreicht, dass nur die Adsorptionsfront der schwächer bindenden Komponente bzw. die Desorptionsfront des Starkbinders abgezogen wird. Der Mischbereich bleibt jeweils in den Säulen von Zone II und III.

Die vollkontinuierliche Fahrweise mit mindestens vier Säulen geht aber mit großem apparativem Aufwand einher. Die Säulenschaltung erfolgt wahlweise über Rotationsventile oder mehrere Einzelventile [Rodrigues 2015, Strube 2000]. Weiterhin sind mindestens vier, häufig fünf Pumpen notwendig.

Die Einsäulen SMB stellt eine apparativ einfachere Variante dar, welche allerdings nur semikontinuierlich betrieben werden kann [Abunasser 2003, Mota 2005, Zobel 2014].

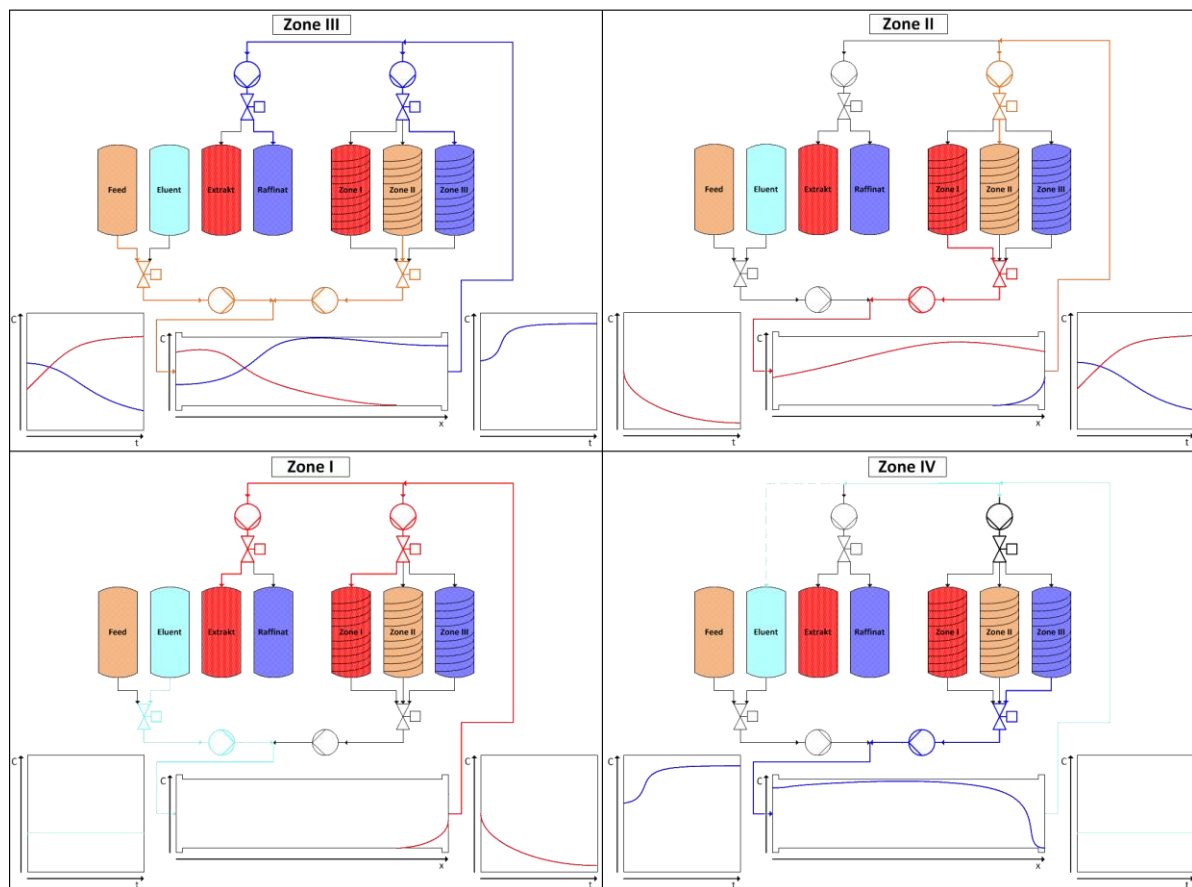


Abbildung 12: Fließbilder eines Zyklus einer 1-SMB. Dargestellt ist das Taktende kurz vor Weiterschaltung in die nächste Zone.

Abbildung 12 zeigt schematisch den Ablauf eines 1-SMB Zyklus. Die einzelne Säule durchläuft dabei dieselben Schritte, wie sie auch jede Säule im klassischen SMB Prozess durchläuft. Im Gegensatz zu diesem ist die Säule allerdings nicht mit anderen Säulen verbunden. Der Austausch von Konzentrationsprofilen von Säule zu Säule findet daher über Behälter statt. Dabei kann es sich um Verweilzeitstrecken oder Rührkessel handeln. Die Säule übernimmt nicht das Gemisch der vorherigen Säule, sondern das eigene Eluat aus dem Zyklus davor. Die Zonen werden in folgender Reihenfolge durchlaufen [Zobel 2014]:

Zone III: Die Säule wird mit Feed und dem Eluat aus Zone II des vorherigen Zyklus beladen. Reines Raffinat verlässt die Säule. Der Raffinatstrom wird aufgeteilt. Ein Teil wird in der Verweilzeitstrecke für Zone III gespeichert, der andere Teil wird als Produkt abgezogen.

Zone II: Die Säule wird aus dem Zone I Tank beladen. Es eluiert das nicht vollständig getrennte Gemisch, welches im Zone II Tank gespeichert wird.

Zone I: Die Säule wird mit frischem Eluenten regeneriert. Reines Extrakt wird von der Säule gewaschen und ebenfalls aufgeteilt in einen Produkt- und einen Speicherstrom.

Zone IV: Die leere Säule wird mit Raffinat aus dem Zone III Tank vorbeladen. Dies entspricht dem Closed Loop Gedanken. Es besteht die Möglichkeit, den Eluenten zu recyceln. Dieses ist in Abbildung 12 nicht abgebildet. Die Vorbeladung der Säule verbessert zudem in vielen Fällen die Trennung.

Die hier gezeigte Verschaltung stellt eine von vielen Möglichkeiten dar. Das Grundprinzip wurde bereits von Arbeitsgruppen um Abunasser und Mota entwickelt [Abunasser 2003, Abunasser 2005, Abunasser 2006, Araújo 2007, Mota 2005].

Die unterschiedlichen Ansätze unterscheiden sich in der Art der Verweilzeitstrecken bzw. Tanks. In Abbildung 12 sind jeweils drei Verweilzeitstrecken abgebildet. Bei gleicher Fluidodynamik der Säule und der Verweilzeitstrecken wäre keine Verschlechterung der Trennung im Vergleich zur klassischen SMB zu erwarten. Allerdings ist die technische Umsetzung von Verweilzeitstrecken mit gleicher Fluidodynamik nicht einfach.

Gleiches gilt für die Idee, nur eine Verweilzeitstrecke zu benutzen [Abunasser 2003, Abunasser 2003].

Einfacher ist die Verwendung von Tanks. Allerdings vermischt sich dabei gerade in den Tanks für Zone II wieder das bereits getrennte Gemisch. Dies verschlechtert die Trennung [Abunasser 2003].

Eine konsequente Vereinfachung des Prozesses führt zu dem in Abbildung 13 gezeigten Design. An Stelle von Tanks für jede Zone werden die Feed- und Produkttanks genutzt. Dies reduziert den apparativen Aufwand von vier auf eine Pumpe und auf ein Minimum von acht Ventilen. Zu erwarten ist eine ähnliche Verschlechterung der Trennleistung wie für das Konzept mit gerührten Zonentanks, die dennoch die Trennleistung einer Batch-Säule übersteigt.

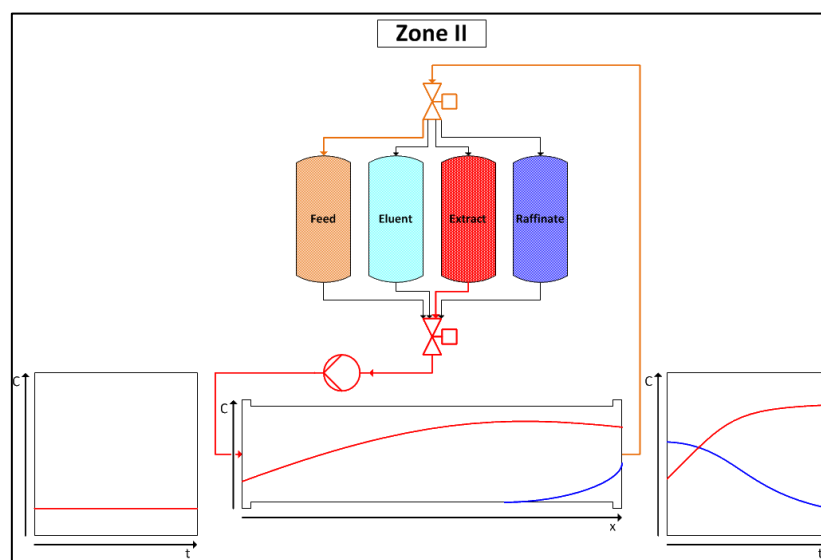


Abbildung 13: Reduziertes Anlagendesign für die 1-SMB, beispielhaft für Zone II.

Es findet hier weder eine kontinuierliche Feedbeladung noch eine kontinuierliche Produktgewinnung statt. Der Prozess wird als semikontinuierlich betrachtet. Angestrebt wird keine möglichst schnelle Aufreinigung eines Batches über eine (Batch-) Säule sondern eine kontinuierliche Aufreinigung in mehreren aufeinanderfolgenden Zyklen. Im Vergleich zum korrespondierenden Batch Prozess wird eine wesentlich kleinere Säule verwendet. Dies führt zu geringeren Investitionskosten und einem kleineren Anlagenfootprint. Weiterhin stellt sich nach wenigen Anfahrzyklen ein zyklischer stationärer Zustand ein.

Das hier gezeigte Prinzip unterscheidet sich von den bisher veröffentlichten durch die Verwendung einzelner Tanks bzw. Verweilzeitstrecken für jede Zone an Stelle von einer einzigen Verweilzeitstrecke für alle Zonen. Die Machbarkeit

soll an einem bekannten SMB Testgemisch bestehend aus Cyclopentanon und Cycloheptanon auf Normalphasen Säulen getestet werden [Juza 1999]. Dies geschieht zunächst über Simulationsstudien.

2.2.2 Integrated Counter Current Chromatography (iCCC)

Die bisher vorgestellte 1-SMB als Analogie zum vier Zonen Konzept erlaubt nur eine binäre Trennung. Grundsätzlich können über weitere Zonentanks bzw. Verweilzeitstrecken auch SMB Prozesse mit mehr als vier Zonen abgebildet werden. Damit wäre auch die Gewinnung einer Mittelfraktion möglich. Es bleibt die gleiche nicht Anwendbarkeit eines Gradienten. Würde beispielhaft eine Ionenaustauschchromatographie mit Salzgradient als 1-SMB betrieben, so würde der Gradient ebenfalls in den Zonentanks gespeichert. Die Salzfracht wäre so hoch, dass damit keine Beladung der Säule möglich wäre. Dieses Problem ist bereits in Kapitel 2.1.3.2 für die Zweisäulen MCSGP beschrieben. Bei dieser besteht die Lösung des Problems in der Verdünnung der Fraktionen vor der Wiederbeladung.

Vorarbeiten auf dem Gebiet der Ionenaustausch und hydrophoben Interaktionschromatographie haben bereits gezeigt, dass beide mit dem gleichen Puffersystem betrieben werden können [Helling 2012]. Dabei wird der Ionenaustauscher mit sehr geringer Salzkonzentration, die hydrophobe Interaktionschromatographie mit hoher Salzkonzentration beladen. Dies kann genutzt werden, um zwei 1-SMB mit Gradientenelution integriert zu betreiben.

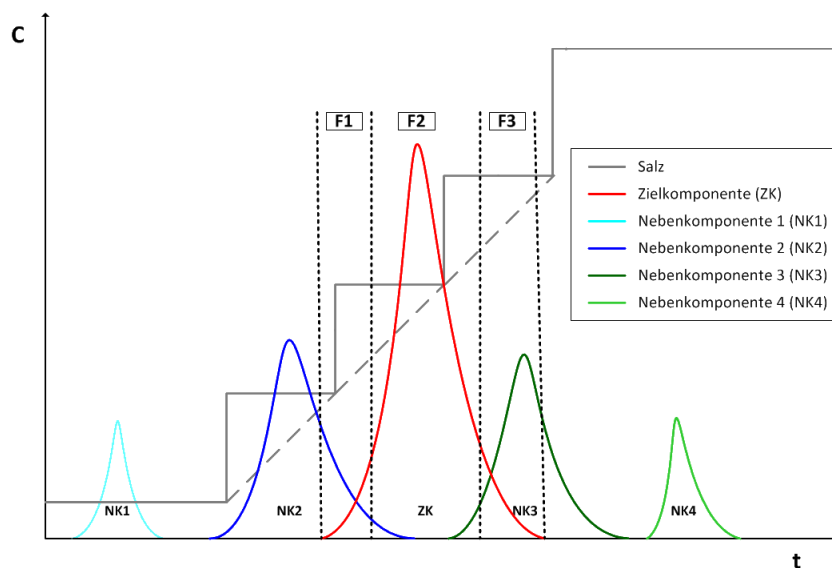


Abbildung 14: Chromatogramm einer Ionenaustausch Chromatographie. In grau dargestellt ist die Salzkonzentration als linearer Gradient (gestrichelte Linie) oder Stufengradient (durchgezogene Linie).

Abbildung 14 zeigt schematisch den Verlauf der Konzentrationen bei einer Ionenaustausch Chromatographie. Die NebenkompONENTEN 1 und 4 spielen hier keine Rolle, da sie so schwach (NK1) bzw. so stark (NK4) binden, dass sie keinen Überlappungsbereich mit der Zielkomponente haben. Für den Fall einer sechs Zonen SMB könnte das Chromatogramm wie folgt aufgeteilt werden. Es gäbe je eine Zone für die drei reinen Produkte. Dies wären Zone I, III und V. Je zwei Zonen für die Überlappungsbereiche (Zone II und IV). Sowie eine für die regenerierte Säule (Zone VI). Die Zonen I-III sowie VI sind im vorgestellten 4 Zonen Konzept vertreten, die Zonen IV und V werden für die zusätzliche Komponente benötigt.

Die NebenkompONENTEN können nicht als Produkt verwertet werden. Sie werden daher nicht aufgefangen und die Zonentanks hierfür entfallen. Gleiches gilt für die Regenerationszone und den hier enthaltenen Eluenten. Es bleiben daher nur drei Zonen über, die im Folgenden als Fraktionen bezeichnet werden. In Abbildung 14 ist zu erkennen, dass die Fraktionen unterschiedliche Salzkonzentrationen aufweisen. Fraktion 1 (F1) enthält relativ wenig Salz. Die Konzentration ist hoch genug zur Elution der NebenkompONENTE, reicht aber im Mittel zum Binden der Zielkomponente auf der gleichen IEX Säule aus. Fraktion 2 könnte so eng geschnitten werden, dass reines Produkt entstünde. Da aber eine Kombination zweier Trennmechanismen angestrebt wird, kann hier Verunreinigung akzeptiert werden. Die Salzkonzentration in dieser Fraktion ist relativ hoch. Die Fraktion kann so nicht wieder auf den Ionenaustauscher beladen werden. Sie wird daher auf die hydrophobe Interaktionschromatographie geladen. Das gleiche gilt für den Überlappungsbereich zwischen Zielkomponente und starkbindender NebenkompONENTE (Fraktion 3).

Damit können die Fraktionen 2 und 3 auch zu einer Fraktion zusammengefasst werden.

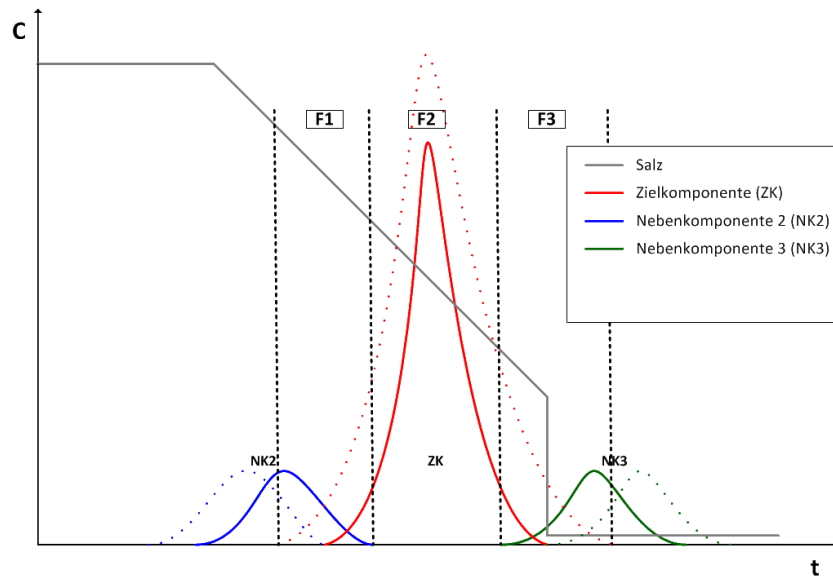


Abbildung 15: Chromatogramm einer Hydrophoben Interaktionschromatographie. Die farbigen, gepunkteten Linien deuten den erwarteten Verlauf nach mehreren Wiederbeladungszyklen an.

Für die Hydrophobe Interaktionschromatographie, deren Konzentrationsverlauf in Abbildung 15 dargestellt ist, gilt eine ähnliche Logik. Die erste Fraktion (F1) liegt am Anfang des Gradienten. Sie enthält viel Salz und wird auf dieselbe Säule rezykliert. Fraktion zwei enthält reines Produkt. Die Produktfraktion wird auch entsprechend eng geschnitten. Fraktion drei enthält den Überlappungsbereich mit Starkbinder bei geringer Salzkonzentration. Diese Fraktion kann auf den Ionenaustauscher geladen werden.

Die einzelnen Beladungs- und Fraktionsschritte sind in Abbildung 16 dargestellt.

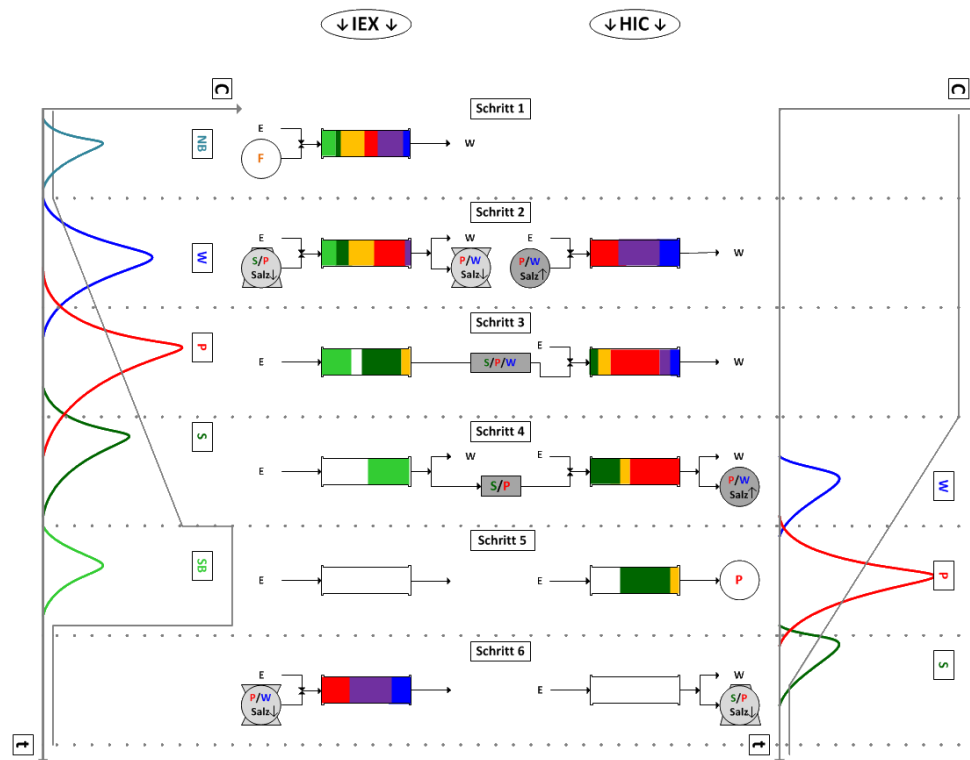


Abbildung 16: Prozessschema der Integration einer Ionenaustausch und einer Hydrophoben Interaktionschromatographie zur integrated Counter Current Chromatography (iCCC).

Das Ziel der integrated Counter Current Chromatography (iCCC) Verschaltung ist es, alle unreinen Fraktionen, die Zielkomponente enthalten, aufzufangen und in die der Elutionskonzentration entsprechenden Säule zurückzuführen. Für den Fall einer IEX/HIC Verschaltung bedeutet das, dass Fraktionen, welche bei niedriger Salzkonzentration eluieren wieder in die IEX-Säule geladen werden. Fraktionen mit hoher Salzkonzentration werden auf die HIC gegeben. Im Einzelnen ergeben sich daraus sechs Schritte pro Zyklus:

Schritt 1: Die bereits in Schritt 6 vorbeladene IEX Säule wird mit Feed beladen. Es folgt ein Waschschrift, bevor der Elutionsgradient startet (Schritt 2).

Schritt 2: Der Gradient (E) startet. Gleichzeitig wird die Ionenaustauscher-Säule mit der in Schritt 6 aus der HIC-Säule kommenden Fraktion beladen. Diese enthält die stärker bindende Komponente (S) sowie Produkt (P). Es wird produktfreie Leichtbinder-Komponente abgezogen und entsorgt (W). Wenn die Zielkomponente zu eluieren beginnt, wird auf einen Auffangbehälter (W/P) umgeschaltet. Dadurch wird die durch Leichtbinder verunreinigte Zielkomponenten-

Fraktion aufgefangen. Die Salzkonzentration in dieser Fraktion ist im Mittel niedrig. Die HIC wird mit der Mixfraktion (P/W) aus HIC-Schritt 4 beladen.

Schritt 3: Die IEX wird weiter eluiert. Die nun eluierende Produktfraktion wird entweder direkt auf die HIC-Säule geladen oder in einem Tank zwischengespeichert. Die Wahl der Schnittpunkte hängt von unterschiedlichen Faktoren ab. Das Hauptaugenmerk sollte auf dem idealen Kompromiss zwischen Reinheit der transferierten Komponente und dem Fraktionsvolumen liegen.

Schritt 4: Der Salzgradient in der IEX läuft aus. Die P/S-Fraktion wird ebenfalls direkt auf die HIC geladen oder gespeichert. Auf der HIC-Säule beginnt nun der Salzgradient von der höchsten Salzkonzentration aus abzusinken. Es wird Zielprodukt freie Komponente abgeführt. Ab Elutionsbeginn der Zielkomponente wird die nun ausgetragene Mixfraktion in den (P/W) Behälter geleitet.

Schritt 5: Die IEX wird gewaschen und regeneriert. Von der HIC eluiert die im Idealfall reine Zielkomponente.

Schritt 6: Der Ionenaustauscher wird mit der IEX-Mischfraktion aus Schritt zwei vorbeladen. Von der HIC-Säule eluiert die Mischfraktion, welche im IEX-Schritt 2 zur Beladung genutzt wird.

Nach Schritt 6 endet der Zyklus und beginnt von vorne. Es sei darauf hingewiesen, dass es zwei Behälter gibt, welche ein Gemisch aus Leichtbinder (W) und Produkt (P) enthalten. Diese unterscheiden sich jedoch in ihrem Salzgehalt und dürfen nicht in einem Behälter zusammengefasst werden. Sie sind daher in Abbildung 16 durch unterschiedliche Symbole gekennzeichnet.

Der Vorteil der gerade vorgestellten Fahrweise liegt zum einen in der durch die Rückführung erzeugten Aufkonzentrierung und dem damit einhergehenden Verdrängungseffekt [Seidel-Morgenstern 1995]. Zum anderen können im Vergleich zur Batch-Chromatographie enger geschnittene Produktfraktionen mit damit einhergehender höherer Reinheit abgezogen werden, ohne Ausbeuteverluste zu erzeugen. Letztere werden durch die Rückführung auf ein Minimum reduziert.

Die Verschaltung ist nicht nur für eine Kombination aus Ionenaustausch und Hydrophober Interaktionschromatographie möglich. Es gehen auch andere

Kombinationen mit sich entgegengesetztem Elutionsverlauf bei an sich gleichen Puffer oder Lösemittelsystemen. So ist auch eine Kombination aus Normal und Reversed Phase denkbar.

3. Modellierung und Simulation

In Kapitel 2 wurden mehrere kontinuierliche Chromatographieprozesse vorgestellt. Diese zeichnen sich alle durch die Verwendung mehrerer Säulen in teils sehr komplexen Verschaltungen aus. Eine rein experimentelle Evaluierung des besten Prozesses und anschließende Auslegung wäre sehr zeit- und kostenintensiv. Dies ist auch unter Berücksichtigung des teuren Feeds bei biopharmazeutischen Produkten nicht sinnvoll.

Es wird daher auf physikochemische Modellierung des Chromatographieprozesses zurückgegriffen. Diese ermöglicht es, ein Modell für die Batch-Chromatographie zu erstellen, dessen Parameter in wenigen, einfachen Versuchen bestimmt werden können. Das Modell kann anschließend an einer Batch Säule validiert werden. Die Replikation dieses Modells und die Modellverschaltung erlaubt die Simulation aller vorgestellten Varianten in kürzester Zeit und ohne weitere Versuche. Es können sowohl Prozessvergleiche durchgeführt als auch Betriebsparameter bestimmt werden.

3.1 Modellierung

3.1.1 Stand der Technik und Implementierung für partikuläre Chromatographie

In der Verfahrenstechnik finden diverse Modelle mit unterschiedlichem Detaillierungsgrad Anwendung. Die Komplexität richtet sich dabei nach der Fragestellung und reicht von einfachen Black Box Modellen für z.B.: Prozessfluss Analysen über Stufen und Dispersionsmodelle bis zu komplexen Modellen beispielsweise für die Fluidodynamik [Bachem 1995, Keil 2010, Luyben 1990, Puigjaner 2006, Thévenin 2008].

Für die Chromatographie haben sich vor allem Dispersionsmodelle im Allgemeinen und das General Rate Model (GRM) im Speziellen durchgesetzt. Dieses bezieht den fluiddynamischen Transport und Rückvermischungseffekte ebenso ein wie Stofftransportwiderstände und das thermodynamische Gleichgewicht zwischen den zu trennenden Substanzen in der flüssigen und auf der stationären Phase [Gu 2015, Guiochon 2006, Kaczmariski 2002, Mehay 2014, Raghavan 1983, Ruthven 1984, Strube 1996, Strube 2000].

Eine analytische Lösung der Massenbilanzen des General Rate Models ist nur für lineare Isothermen möglich. Im nicht-linearen Fall muss auf numerische

Methoden zurückgegriffen werden. Die dafür vorhandene Rechenleistung stellte in der Vergangenheit ein Problem dar. Es existieren jedoch vereinfachte Modelle. Das „Ideal Model“ betrachtet nur den konvektiven Stofftransport sowie das Gleichgewicht. Axiale Dispersion oder Stofftransportwiderstände entfallen [DeVault 1943, Golshan-Shirazi 1988, Golshan-Shirazi 1994, Wilson 1940].

Das „Equilibrium Dispersive Model“ hingegen fasst die axiale Dispersion und den Stofftransport in einem Parameter zusammen [Golshan-Shirazi 1992, Golshan-Shirazi 1994].

Für die Vorhersage und Auslegung präparativer Chromatographie hat sich die vollständige Entkoppelung der Phänomene, wie es im General Rate Model gegeben ist, bewährt. Dies ermöglicht es auch, die Modellparameter entkoppelt voneinander zu bestimmen. Dadurch behalten die einzelnen Parameter zumeist auch dann ihre Gültigkeit, wenn sich einer der anderen Parameter ändert. Dies ist gerade für den Up-Scale aus dem Labor in den Produktionsmaßstab wichtig. Durch die Änderung der Säulendimension und Peripherie tritt zumeist eine andere Fluidodynamik auf. Bei Verwendung des gleichen Adsorbens sind der Stofftransport und das Gleichgewicht davon jedoch nicht betroffen. In diesem Fall reichen einfache fluiddynamische Messungen an der präparativen Säule aus um das Modell anzupassen. Die anderen, im Labor bestimmten Parameter bleiben unverändert [Altenhöner 1997, Seidel-Morgenstern 1995, Strube 1996, Strube 2000].

In dieser Arbeit findet das General Rate Model Anwendung. Die Herleitung des zu Grunde liegenden axialen Dispersionsmodells ist in der Literatur hinreichend häufig beschrieben [Borrmann 2012, DeVault 1943, Wicke 1939, Wilson 1940].

Alle Ausführungen in den folgenden Kapiteln beziehen sich primär auf die Biochromatographie, sofern sie nicht allgemeingültig sind. Auf Abweichungen, sofern vorhanden, wird an entsprechender Stelle eingegangen.

3.1.1.1 Massenbilanzen

Das General Rate Model lässt sich in drei Bereiche unterteilen. Dies sind die Massenbilanz für die mobile Phase außerhalb der Partikel, die Massenbilanz der flüssigen Phase innerhalb des Porensystems sowie das Gleichgewicht

zwischen den Komponenten in der flüssigen und auf der stationären Phase. Es gelten dabei folgende Annahmen [Guiochon 2006, Kaczmarek 2002]:

- Das Fluid ist inkompressibel.
- Die Partikel sind uniform und gleich verteilt.
- Die Partikel sind sphärisch und porös.
- Die Dispersion in axialer Richtung ist konstant
- Die Dispersion in radialer Richtung ist vernachlässigbar
- Es handelt sich um einen isothermen Prozess.

Aus den ersten beiden Bedingungen ergibt sich zudem, dass die Geschwindigkeit der fluiden Phase in der Kernströmung konstant sein muss.

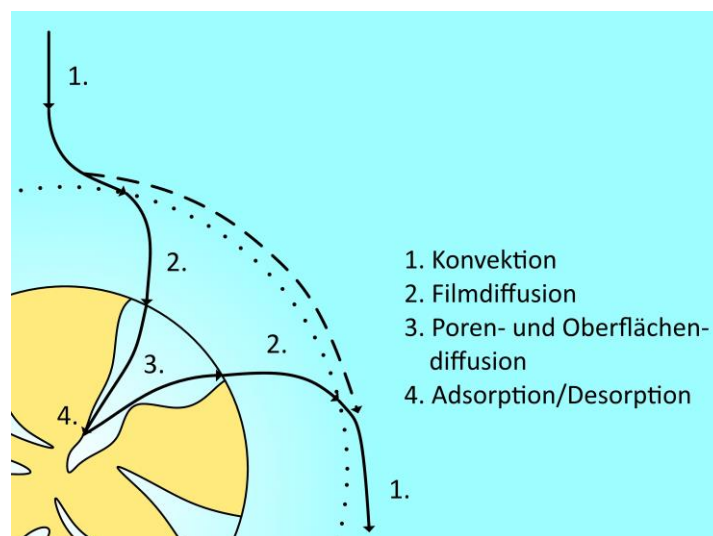


Abbildung 17: Strömungs- bzw. Diffusionsverlauf an einem Partikel in der konvektiven Kernströmung. Die durchgezogene Linie symbolisiert die Bewegung eines Teilchens. Die gepunktete Linie stellt die Phasengrenze dar. Die gestrichelte Linie den Strömungsverlauf der Kernströmung um den Partikel. Der blaue Farbverlauf deutet den Konzentrationsverlauf an.

Die Massenbilanz für die frei strömende, mobile Phase außerhalb der Partikel wird von den drei Termen Konvektion, Dispersion und dem Stofftransportterm gebildet. Sie lautet [Guiochon 2006]:

$$\frac{\partial c_i}{\partial t} = -u_{int} \cdot \frac{\partial c_i}{\partial x} + D_{ax} \cdot \frac{\partial^2 c_i}{\partial x^2} - \frac{6}{d_p} \cdot \frac{(1 - \varepsilon_s)}{\varepsilon_s} \cdot k_{f,i} \cdot \left(c_i - c_{p,i} \Big|_{r=R_p} \right) \quad (17)$$

Mit u_{int} als Fließgeschwindigkeit des Fluids zwischen den Partikeln, D_{ax} als axialer Dispersionskoeffizient, d_p als Partikeldurchmesser und k_f als effektiver Stofftransportwiderstand von der konvektiven Strömung in die Poren des Partikels. Entgegen der Darstellung in Abbildung 17, welche den realen

Verlauf abbilden soll, wird der Stofftransport durch die Grenzschicht als linear angenommen. Die treibende Kraft ist dabei das Konzentrationsgefälle zwischen der Konzentration c_i in der Kernströmung am äußeren Rand der Grenzschicht und der Porenkonzentration $c_{p,i}$ am Übergang zwischen Grenzschicht und Pore. Hier ist der Abstand r von der Partikelmitte gleich dem Partikelradius R_p .

Die Massenbilanz für die mobile Phase innerhalb der Poren wird von der Poren- und Oberflächendiffusion $D_{p,i}$ respektive $D_{s,i}$ bestimmt [Kaczmarski 2002, Kaczmarski 2002, Piątkowski 2003]:

$$\begin{aligned} \varepsilon_{p,i} \cdot \frac{\partial c_{p,i}}{\partial t} + (1 - \varepsilon_{p,i}) \cdot \frac{\partial q_i}{\partial t} \\ = \frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left[r^2 \left(\varepsilon_{p,i} \cdot D_{p,i} \cdot \frac{\partial c_{p,i}}{\partial r} + (1 - \varepsilon_{p,i}) \cdot D_{s,i} \frac{\partial q_i^*}{\partial r} \right) \right] \end{aligned} \quad (18)$$

Dabei ist q_i die Beladung der Komponente i auf der stationären Phase. q_i^* ist die Beladung direkt an der Oberfläche, welche im Gleichgewicht mit der flüssigen Phase steht.

Es wird häufig davon ausgegangen, dass der Stofftransportwiderstand des Films und die Porendiffusion die geschwindigkeitsbestimmenden Schritte sind und die Oberflächendiffusion eine untergeordnete Rolle spielt [Guiochon 2006]. Die Oberflächendiffusion gilt in der Flüssigchromatographie, im Gegensatz zur Gasphasen Adsorption [Kapoor 1989, Ruthven 1984], als nicht gut untersuchter und verstandener Parameter. Zudem fokussieren sich die Arbeiten mehr auf kleine Moleküle für Reversed Phase Adsorbentien, nicht auf Biomoleküle [Carta 2010, Ma 1996, Miyabe 2007].

Beide Diffusionsvorgänge werden daher gemäß Gleichung (19) in einem effektiven Diffusionskoeffizienten D_{eff} zusammengefasst [Piątkowski 2003]:

$$D_{eff,i} = \varepsilon_{p,i} \cdot D_{p,i} + (1 - \varepsilon_{p,i}) \cdot D_{s,i} \frac{\partial q_i^*}{\partial c_{p,i}} \quad (19)$$

Eingesetzt in Gleichung (18) ergibt sich die Massenbilanz innerhalb der Pore daher vereinfacht zu:

$$\varepsilon_{p,i} \cdot \frac{\partial c_{p,i}}{\partial t} + (1 - \varepsilon_{p,i}) \cdot \frac{\partial q_i}{\partial t} = D_{eff,i} \left(\frac{\partial^2 c_{p,i}}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \cdot \frac{\partial c_{p,i}}{\partial r} \right) \quad (20)$$

Auf Grund der Betrachtung der Konzentrationsverläufe sowohl in axialer Richtung entlang der Säule als auch in radialer Richtung innerhalb der Partikel und der damit einhergehenden Diskretisierung im Computermode'll in zwei Raumrichtungen wird im Folgenden bei der Verwendung von Gleichung (18) und (20) vom 2D Modell gesprochen. Sofern nicht anders angegeben, wird dieses Modell verwendet.

Da die Anzahl der zu lösenden Gleichungen proportional zur Anzahl an Diskreten ist, erhöht sich die Rechenleistung bei der Berücksichtigung von Stofftransportphänomenen innerhalb des Partikels enorm. Für eine schnellere, wenn auch ungenauere Betrachtung chromatographischer Prozesse wird daher hier auch ein Modell ohne Porendiffusion verwendet. Dabei werden sämtliche Transportvorgänge innerhalb der Pore mit dem Filmwiderstand zu einem effektiven Stofftransportwiderstand k_{eff} zusammengefasst. Damit gibt es nur eine Massenbilanz für die flüssige Phase, entsprechend Gleichung (21):

$$\frac{\partial c_i}{\partial t} = -u_{int} \cdot \frac{\partial c_i}{\partial x} + D_{ax} \cdot \frac{\partial^2 c_i}{\partial x^2} - \frac{6}{d_p} \cdot \frac{(1 - \varepsilon_s)}{\varepsilon_s} \cdot k_{eff} \cdot (c_i - c_{p,i}) \quad (21)$$

Dies hat zudem den experimentellen Vorteil, weniger Parameter bestimmen zu müssen, was gerade in der frühen Verfahrensentwicklung und zur schnellen Evaluation von Prozessvarianten vorteilhaft ist. Auf Grund der Betrachtung in nunmehr nur noch eine Raumrichtung wird dieser Ansatz im Folgenden als 1D Modell bezeichnet.

Zur Lösung der partiellen Differentialgleichungen werden zudem Randbedingungen benötigt. Je nachdem, ob nur konvektiver oder auch diffusiver Stofftransport über die Bilanzraumgrenzen hinaus möglich ist, wird von offenen (22) oder geschlossenen (23) Randbedingungen gesprochen [Danckwerts 1953, Levenspiel 1999]. Beide finden in der Chromatographie Anwendung [Rosen 1952, Wehner 1956]. Für die Massenbilanz der fluiden Phase gelten die Randbedingungen:

$$\left[u_{int} \cdot c_i - D_{ax} \cdot \frac{\partial c_i}{\partial x} \right]_{x=0} = u_{int} \cdot c_{Eingang,i} \quad (22)$$

$$\left. \frac{\partial c_i}{\partial x} \right|_{x=L} = 0 \quad (23)$$

Für die Massenbilanz innerhalb der Poren gilt:

$$\left. \frac{\partial c_{p,i}}{\partial r} \right|_{r=0} = 0 \quad (24)$$

$$2 \cdot D_{p,i} \cdot \left. \frac{\partial c_{p,i}}{\partial r} \right|_{r=R_p} = 3 \cdot k_{f,i} (c_i - c_{p,i}|_{r=R_p}) \quad (25)$$

Hierbei ist $r=0$ die Partikelmitte und R_p der Partikelradius.

3.1.1.2 **Adsorptionsgleichgewicht**

Wesentlichen Einfluss auf die chromatographische Trennung hat das Gleichgewicht zwischen den sich in Lösung befindenden und den auf der Feststoffoberfläche adsorbierten Molekülen. Zur korrekten Beschreibung dieses Gleichgewichts wurden unterschiedliche Modelle entwickelt. Das am häufigsten verwendete ist das in Abbildung 18 dargestellte Modell nach Langmuir [Langmuir 1918]. Diesem liegen einige Annahmen und Einschränkungen zugrunde [Atkins 2012, Langmuir 1918]:

- Adsorption in nur einer monomolekularen Schicht.
- Die Anzahl an Adsorptionsplätzen ist begrenzt.
- Die Adsorptionsplätze sind energetisch gleich und gleichmäßig verteilt.

Unregelmäßigkeiten in der Adsorptionsoberfläche, die z.B. zu sterischen Behinderungen führen könnten, werden nicht berücksichtigt. Ebenso etwaige Wechselwirkungen zwischen den Adsorptionsplätzen selbst.

Das Gleichgewicht zwischen der Beladung q_i und der korrespondierenden Konzentration c_i lässt sich damit in Abhängigkeit des Gleichgewichtskoeffizienten K_i und der maximalen Beladung $q_{\max,i}$ entsprechend Gleichung (26) ausdrücken [Carta 2010]:

$$q_i = \frac{q_{\max,i} \cdot K_i \cdot c_i}{1 + \sum_{j=1}^n K_j \cdot c_j} \quad (26)$$

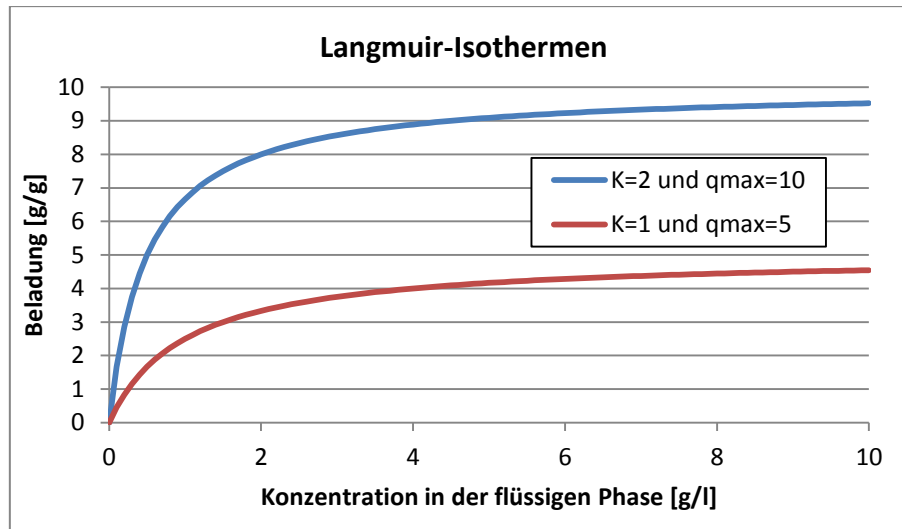


Abbildung 18: Beladung der stationären Phase in Abhängigkeit von der Gleichgewichtskonzentration. Aufgetragen für zwei Komponenten, entsprechend der Langmuir-Isotherme.

Eine ausführliche Herleitung dieser Gleichung findet sich unter anderem bei Carta und Jungbauer [Carta 2010]. In der Literatur sind diverse Schreibweisen für Formel (26) verbreitet. Die hier Dargestellte eignet sich auf Grund der Angabe der maximalen Beladung $q_{\max,i}$ gut in Zusammenhang mit der Auslegung der Säulengröße. Zudem wird die maximale Beladung von Adsorbentien Herstellern für diverse Stoffe angegeben, was einen guten Vergleich der eigenen Messungen erlaubt. Teilweise wird an Stelle des Gleichgewichtskoeffizienten K_i der Henry-Koeffizient H_i verwendet. Die beiden Parameter stehen in der in Gleichung (27) aufgeführten Beziehung zueinander [Cavazzini 2003]:

$$H_i = q_{\max,i} \cdot K_i \quad (27)$$

In Literaturstellen, die sich vornehmlich mit der Bestimmung der Adsorptionsparameter beschäftigen, findet man meist keine der genannten Parameter. Hier wird häufig nur a_i und b_i als Parameter benutzt. a_i entspricht dabei meistens dem Henry-Koeffizienten, also dem Faktor im Zähler. b_i ersetzt K_i und ist somit der Parameter im Divisor des Quotienten (26). Diese Schreibweise wird hier nicht verwendet. Die Parameter a_i und b_i werden in dieser Arbeit verwendet, um die Salzabhängigkeit des Henry-Koeffizienten und der maximalen Beladung zu beschreiben (Siehe Modellparameter Bestimmung, Kapitel 3.2.5).

Das Adsorptionsmodell nach Langmuir zeichnet sich besonders durch das Erreichen einer maximalen Beladung bei hoher Gleichgewichtskonzentration aus. Im Gegensatz dazu streben die meisten anderen Isothermen Formen, wie z.B. BET oder Freundlich, nicht auf einen fixen Endwert zu [Carta 2010, Guiochon 2006, Mazzotti 2006, Seidel-Morgenstern 2004]. Eine Sonderform der Gleichgewichtsbetrachtung stellt das speziell für die Ionenaustausch Chromatographie entwickelte Steric Mass Action Modell dar [Brooks 1992]. Dieses zieht abstoßende Kräfte zwischen den einzelnen Ionen besonders in Betracht [Chen 2006, Iyer 1999, Wiesel 2003].

Sofern nicht anders angegeben, wird in dieser Arbeit immer die Langmuir-Isotherme verwendet. Dies erlaubt eine schnelle Anpassung des Chromatographie Modells an unterschiedliche Adsorbentien. Zudem haben frühere Versuche gezeigt, dass sich die Adsorption von Proteinen häufig in guter Näherung mit dieser Isothermenform beschreiben lässt. Teilweise ist bei der hydrophoben Interaktionschromatographie ein weiterer, linearer Term sinnvoll [Borrmann 2011, Borrmann 2012, Carta 2010].

3.1.2 Chromatographie-Anlage

Die Chromatographische Trennung bzw. das gemessene Chromatogramm wird nicht allein von den fluiddynamischen Eigenschaften und Stofftransportparametern der Säule bestimmt. Auch die verwendete Anlage kann hierauf einen Einfluss haben [Kempe 2006]. Dieser ist vor allem von der Strömungsgeschwindigkeit abhängig und davon, ob die betrachtete Komponente auf der Säule bindet, oder nicht. Für bindende Komponenten ist der Einfluss geringer, da der Einfluss aller Anlagenteile, die sich vor der Säule befinden, minimiert wird. In allen hier verwendeten Modellen wurde die Anlage entsprechend der Abbildung 19 mit einem Rührkessel und drei Strömungsrohren implementiert.

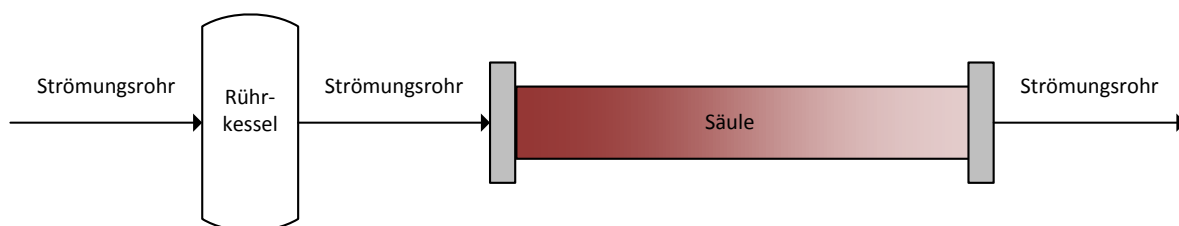


Abbildung 19: Modellierungsansatz für die Beschreibung der Chromatographischen Anlage inklusive der Säule.

Die Massenbilanzgleichungen für den Rührkessel lautet:

$$\frac{\partial c_i}{\partial t} \cdot V = c_{in,i} \cdot \dot{V}_{in} - c_{out,i} \cdot \dot{V}_{out} \quad (28)$$

Da in diesem Fall stets der Eingangsvolumenstrom \dot{V}_{in} gleich dem Ausgangsvolumenstrom \dot{V}_{out} ist, ist keine Änderung des Volumens im Kessel zu berücksichtigen.

Die Massenbilanz für die Strömungsrohre entspricht dem DPF Modell (Formel (17)), jedoch ohne Stofftransport Term.

$$\frac{\partial c_i}{\partial t} = -u \cdot \frac{\partial c_i}{\partial x} + D_{ax} \cdot \frac{\partial^2 c_i}{\partial x^2} \quad (29)$$

Das Modell der Chromatographie-Anlage enthält auch die Probenaufgabe und die Erzeugung des Gradienten. Beides kann zeitgesteuert über Sprungfunktionen oder Rampenfunktionen implementiert werden.

3.1.3 Membranchromatographie

Auch für die Prozesssimulation von Membranadsorbern sind diverse Vorarbeiten vorhanden [Boi 2007, Francis 2011, Francis 2012, Fröhlich 2012, Ladd Effio 2016]. Intensiv diskutiert wurde hierbei vor allem die Fluidodynamik. Abbildung 20 gibt einen Überblick über diese Thematik. Im Gegensatz zur partikulären Chromatographie (A), bei der in der Regel eine axial durchströmte Säule vorliegt und die radiale Strömung vernachlässigt werden kann, sind Membranadsorber Module häufig komplexer aufgebaut. Roper et al. haben zunächst versucht, dieser Problematik mit einem Rührkessel vor und nach der Säule zu begegnen (B) [Roper 1995]. Eine Erweiterung dieses Konzepts ist das „Zonal Rate Model“, welches einer Parallelschaltung des Ansatzes von Roper et al. entspricht (C) [Francis 2011, Francis 2012, Ghosh 2013, Ghosh 2014].

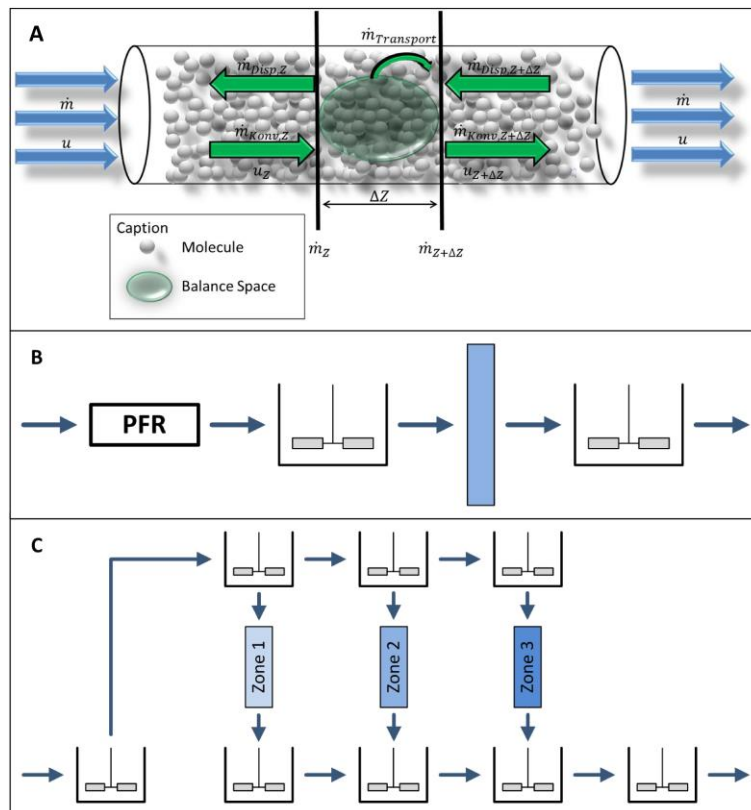


Abbildung 20: Überblick über fluiddynamische Modelle für Membranchromatographie Module. A: Axiales Dispersionsmodell einer Chromatographiesäule; B: Roper-Lightfoot Model [Roper 1995]; C: Zonal Rate Model [Francis 2011, Francis 2012].

In dieser Arbeit wird ein anderer Ansatz verfolgt. Wie in Abbildung 21 dargestellt ist, wird das Modul in fünf Bereiche unterteilt. Es handelt sich dabei um den axialen Einlauf (1), den ebenfalls axial durchströmten Ringspalt auf der Außenseite der Membran (2), die Membran selbst (3), sowie die axialen Ausläufe (4 und 5).

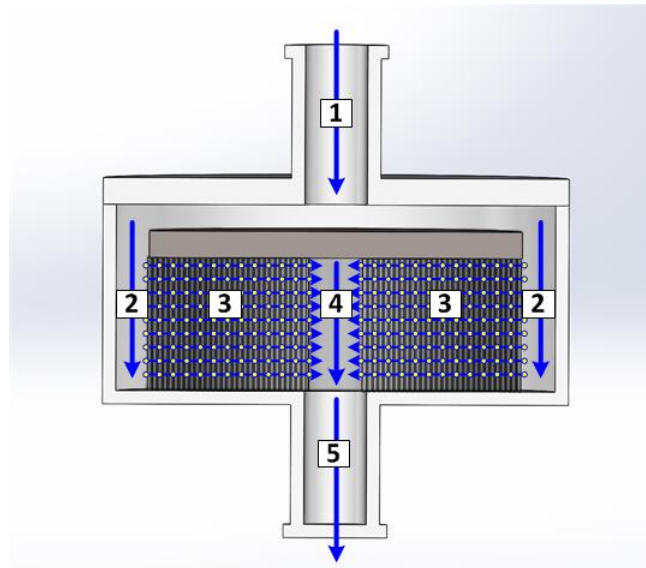


Abbildung 21: Fluiddynamische Verteilung in einem Membranchromatographiemodul.

Jeder der in Abbildung 21 skizzierten Bereiche wird von einer eigenen Massenbilanz beschrieben. Diese sind nachfolgend aufgeführt. Die Bezeichnung der Strömungsrichtung erfolgt mit dem Index x für axiale und r für radiale Strömung. In den Bereichen 1, 3 und 5 liegt nur eine Strömungsrichtung vor. Bei den Bilanzgleichungen dieser Bereiche wird der Übersichtlichkeit halber daher auf das Verwenden der Indices verzichtet.

Bereich 1:

Dieser Bereich stellt den Einlaufbereich in das Modul dar. Er umfasst den Verschluss sowie das Einlaufrohr bis zur Prallplatte. Im Modell wird es wie ein Strömungsrohr gemäß Gleichung (29) berechnet.

Bereich 2:

Dieser Bereich simuliert die Strömung auf der Außenseite des Moduls entlang der Membran. Der Ringspalt wird ebenfalls mit Gleichung (29) implementiert. Die Aufteilung des Volumenstroms in axiale und radiale Richtung wird auf jedem Diskret von einer zusätzlichen Massenbilanz berechnet. Hierbei wird ein konstanter Membranwiderstand angenommen. Das heißt, dass kein Geschwindigkeitsgradient des radialen Flusses entlang des axialen Verlaufs entsteht. Da sich bei der Aufteilung des Volumenstroms die Konzentration der Komponenten nicht ändert, kann an Stelle einer Massenbilanz auch die folgende Volumenstrombilanz verwendet werden:

$$\dot{V}_x = \dot{V}_{x+1} + \dot{V}_r \quad (30)$$

Bereich 3:

Die Massenbilanz für die eigentlichen Membranlagen entspricht weitestgehend der Massenbilanz für partikuläre Chromatographie. Es gilt:

$$\frac{\partial c_i}{\partial t} = -u_{int,r} \cdot \frac{\partial c_i}{\partial r} + D_{ax} \cdot \frac{\partial^2 c_i}{\partial r^2} - kla(c_i - c_{p,i}) \quad (31)$$

Ein Unterschied besteht in der Verwendung eines zusammengefassten Stofftransportparameters kla . Der Parameter kla fasst den effektiven Stoffdurchgangskoeffizienten und die dazu gehörende Fläche in einem Parameter zusammen. Dies hat mehrere Vorteile. Zum einen ist die effektive Oberfläche des Porensystems von Membranen schwieriger zu ermitteln, als dies für sphärische Partikel der Fall ist. Die Angabe einer Porengrößenverteilung, vergleichbar zur Partikelgrößenverteilung des Chromatographiemediums, gibt es in der Regel nicht. Weiterhin existieren wenige Korrelationen zur Beschreibung des Stoffdurchgangskoeffizienten. Beide Parameter müssten also unabhängig voneinander experimentell bestimmt werden. Des Weiteren gilt der Stofftransport bei Membranadsorbern als verhältnismäßig schnell und damit unsensitiv [Schwellenbach 2017].

Die Membran ist, wie auch in Abbildung 21 angedeutet ist, um einen inneren Zylinder gewickelt. Es handelt sich damit um einen radial durchströmten Ringspalt. Die durchströmte Fläche nimmt von außen nach innen ab. Damit nimmt die Strömungsgeschwindigkeit zu. Sie ist also nicht, wie für das General Rate Model angenommen, konstant. Die Strömungsgeschwindigkeit u_{int} ist somit abhängig vom Radius. Entgegen der schematischen Darstellung in Abbildung 21 ist, gerade bei großen Modulen, die Dicke der Membranlagen sehr gering im Vergleich zum Durchmesser des Innenrohrs. Die Höhe aller Membranschichten zusammen liegt typischerweise im Bereich von wenigen Millimetern. Daher sind die Änderung der durchströmten Fläche und damit die Geschwindigkeitsänderung in den meisten Fällen vernachlässigbar.

Bereich 4:

Dieser Bereich ist das Pendant zu Bereich 2. Es gilt Gleichung (29) sowie eine Addition der Volumenströme auf den Diskreten gemäß Gleichung (32). Die

Konzentration pro Diskret ergibt sich aus der Massenbilanz bei bekannten Volumenströmen (Formel (33)):

$$\dot{V}_{x+1} = \dot{V}_x + \dot{V}_r \quad (32)$$

$$\dot{V}_{x+1} \cdot c_{i,x+1} = \dot{V}_x \cdot c_{i,x} + \dot{V}_r \cdot c_{i,r} \quad (33)$$

Bereich 5:

Der Auslauf ist analog zum Einlauf (Bereich 1) implementiert.

Die Unterteilung des Moduls in die genannten Bereiche bietet den Vorteil, die Strömungsverhältnisse auf die vorhandenen Geometrien beziehen zu können. Dies ist bei der Betrachtung über Rührkessel oder Rührkesselkaskaden nicht möglich. Damit wäre das Model grundsätzlich in der Lage, Module unterschiedlicher Größe zu berechnen, sofern die Strömungsregime bei beiden Modulgrößen ähnlich sind. Dieses Vorgehen setzt jedoch voraus, dass die Geometrie der einzelnen Bereiche bekannt und die axialen Dispersionskoeffizienten hierfür bestimmbar sind.

3.2 Modellparameter Bestimmung

Für die Bestimmung der im Modell verwendeten Parameter gibt es mehrere Ansätze. Am einfachsten und schnellsten ist die Anpassung der Parameter an experimentelle Chromatographieläufe. Dabei werden bei jedem Lauf andere Parameter für z.B. die Flussrate, die Injektionsmenge aber vor allem die Gradientensteigung verwendet. Theoretisch müssen mindestens so viele unterschiedliche Läufe verwendet werden, wie unbekannte Parameter vorhanden sind. In der Praxis kann die Zahl allerdings durch einige Annahmen auf drei bis vier Läufe reduziert werden [Baur 2016, Hahn 2015, Huuk 2017, Teeters 2009].

Das Problem dieser Vorgehensweise ist die Koppelung von Phänomenen. Fluidodynamik, Stofftransport und Gleichgewicht werden nicht getrennt voneinander betrachtet. Dies macht die Ergebnisse nur für den betrachteten Bereich gültig. Außerhalb des zuvor betrachteten Bereichs sind richtige Ergebnisse nur zu erwarten, wenn sich alle Einflussgrößen in der zuvor gefundenen Proportionalität zueinander ändern. Dies ist häufig für den Upscale vom Labor- auf den präparativen Maßstab nicht der Fall. Im analytischen Maßstab befindet man sich häufig noch im linearen Bereich der Isotherme, so dass diese nicht korrekt bestimmt wird. Bei präparativer Überladung werden dann das Gleichgewicht und damit unter anderem die Säulenkapazität nicht korrekt beschrieben.

Für viele Parameter besteht die Möglichkeit, diese einzeln und unabhängig von den anderen experimentell zu bestimmen. Damit behalten die Parameter auch unabhängig von einer Veränderung der anderen Einflussgrößen ihre Gültigkeit. Dies ist gerade im Bereich des Scale-Ups oder der Prozessentwicklung notwendig. Die experimentelle Einzelparameterbestimmung ist zwar das genaueste Vorgehen, dem gegenüber steht jedoch hoher experimenteller und damit zeitlicher Aufwand [Altenhöner 1997, Strube 2000].

Einige Parameter, gerade jene die Stofftransport- und Diffusionsvorgänge in den Partikeln beschreiben, sind experimentell nur schwer zugänglich. Eine weitere Methode der Parameterbestimmung, die in dieser Arbeit auch Anwendung findet, ist die Verwendung von Korrelationsgleichungen. Hierbei ist besonders darauf zu achten, dass diese nur einen bestimmten

Gültigkeitsbereich haben [Carta 2010, Ladisch 2005, Liberti 1983, Taylor 1993, Traylor 2014].

Die in dieser Arbeit verwendeten Bestimmungsmethoden für die Parameter der Gleichungen (17) bis (33) werden im Folgenden aufgeführt. Die Sortierung entspricht der Reihenfolge des ersten Auftretens.

3.2.1 Axialer Dispersionskoeffizient D_{ax}

Für den axialen Dispersionskoeffizient D_{ax} wird sowohl ein experimenteller als auch ein Korrelations-Ansatz verfolgt. Für die partikuläre Säulenchromatographie sind diverse Korrelationen bekannt. Auf Grund des großen Gültigkeitsbereiches von $10^{-3} < Re < 10^3$ und der weiten Verbreitung wird hier die Gleichung nach Chung und Wen verwendet [Chung 1968]:

$$D_{ax} = \frac{\varepsilon_s \cdot d_p \cdot u_{int}}{0,2 + 0,011 \cdot Re^{0,48}} \quad (34)$$

Mit der Reynolds-Zahl Re definiert für gepackte Partikelbetten als [Chung 1968]:

$$Re_p = \frac{u_{int} \cdot \varepsilon_s \cdot d_p \cdot \rho}{\eta} \quad (35)$$

Dabei ist ρ die Dichte und η die dynamische Viskosität der fluiden Phase.

Da eine vergleichbare Korrelation für Membranadsorber nicht existiert und um die Ergebnisse von Gleichung (34) verifizieren zu können, werden Tracer Versuche zur Bestimmung des axialen Dispersionskoeffizienten durchgeführt. Dabei wird entweder ein Dirac Stoß oder ein Konzentrationssprung auf die Säule gegeben. Welches von beiden ist theoretisch irrelevant. Einen möglichst schmalen Konzentrationspuls auf die Säule zu geben ist jedoch für viele Anlagen im präparativen Maßstab schwierig.

Aus der mittleren Verweilzeit \bar{t} und der Varianz σ^2 der Konzentrationsänderung am Säulenausgang kann über die Gleichungen (36) bzw. (37) der Dispersionskoeffizient bestimmt werden [Levenspiel 1999]:

$$\frac{\sigma^2}{\bar{t}^2} = 2 \cdot \left(\frac{D_{ax}}{v \cdot l} \right) - 2 \cdot \left(\frac{D_{ax}}{v \cdot l} \right)^2 \cdot \left[1 - e^{-\frac{v \cdot l}{D_{ax}}} \right] \quad (36)$$

$$\frac{\sigma^2}{\bar{t}^2} = 2 \cdot \left(\frac{D_{ax}}{v \cdot l} \right) + 8 \cdot \left(\frac{D_{ax}}{v \cdot l} \right)^2 \quad (37)$$

Die beiden Gleichungen sind, analog zu den Danckwerts Randbedingungen, wahlweise für geschlossene (36) oder offene Systeme (37) gültig [Levenspiel 1999].

3.2.2 Lückengrad und Porosität

Für die Bestimmung der totalen Porosität ε_t , der Partikelporosität ε_p und des Lückengrades ε_s wird die inverse Größenausschluss Chromatographie verwendet [DePhillips 2000, Goto 2000]. Dabei werden Tracermoleküle unterschiedlicher Molekülgröße M injiziert und die mittlere Verweilzeit \bar{t}_i gemessen. Diese ist abhängig davon, wie weit die Tracermoleküle in das Porensystem eindringen können. Gleichung (38) gibt den Zusammenhang zwischen mittlerer Verweilzeit und Porosität wieder:

$$\varepsilon_i = \frac{\dot{V} \cdot \bar{t}_i}{V_{\text{Säule}}} \quad (38)$$

Dieser Zusammenhang ist exemplarisch in Abbildung 22 dargestellt. Es entsteht ein typischer S-förmiger Verlauf mit zwei Grenzfällen. Sehr kleine Moleküle können das komplette Porensystem durchdringen. Für sie ist die Porosität ε_i gleich der totalen Porosität ε_t . Sehr große Moleküle dringen gar nicht in die Poren ein. Hier entspricht die gemessene Porosität dem Lückengrad ε_s .

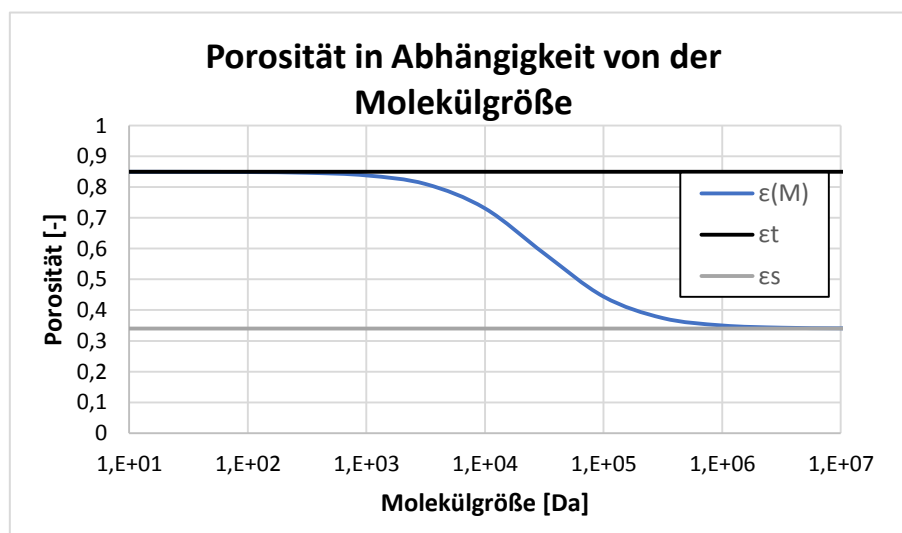


Abbildung 22: Abhängigkeit der Porosität des Festbetts von der Molekülgröße.

Weder die totale Porosität noch der Lückengrad sind von der Molekülgröße abhängig. Diese Abhängigkeit besteht nur für die Partikelporosität $\varepsilon_{p,i}$. Diese kann entsprechend Formel (39) aus den anderen errechnet werden. Dabei ist die totale Porosität ε_t zur Bestimmung der totalen Partikelporosität ε_p zu verwenden, für die größenabhängige Porosität $\varepsilon_{p,i}$ ist jeweils ε_i der entsprechenden Molekülgröße an Stelle der totalen Porosität einzusetzen [Agilent Technologies 2016]:

$$\varepsilon_t = \varepsilon_s + \varepsilon_p \cdot (1 - \varepsilon_s) \quad (39)$$

3.2.3 Stofftransportwiderstand

In Formel (17) wird der Stofftransportwiderstand k_f für den Übergang der Komponenten aus der freien Strömung vom Rand der hydrodynamischen Grenzschicht an den Rand des Partikels bzw. der Pore verwendet. Für Feststoffbetten mit sphärischen Partikeln existieren mehrere Korrelationen zur Bestimmung dieses Parameters, mit unterschiedlichem Gültigkeitsbereich [Dwivedi 1977, Williamson 1963, Wilson 1966]. Die Korrelationen setzen die Sherwood-Zahl Sh mit der Peclet-Zahl Pe sowie teilweise der Reynolds- Re und der Schmidt-Zahl Sc in Relation. Der Stoffdurchgangskoeffizient ist implizit in Sherwood enthalten.

Auf Grund des großen Gültigkeitsbereichs von $0,0016 < Re < 55$ wird in dieser Arbeit die Korrelation nach Wilson und Geankoplis verwendet (Formel (40)) [Wilson 1966]. Diese hat sich im Bereich der Proteinchromatographie weitestgehend durchgesetzt. [Carta 2010, Forrer 2008].

$$Sh_i = \frac{1,09}{\varepsilon_s} Pe_i^{\frac{1}{3}} \quad (40)$$

Mit:

$$Sh_i = \frac{d_p \cdot k_{f,i}}{D_{m,i}} \quad (41)$$

$$Pe_i = \frac{u_{int} \cdot d_p}{D_{m,i}} \quad (42)$$

Einsetzen von (41) und (42) in (40) und umstellen nach k_f ergibt:

$$k_{f,i} = \frac{1,09}{\varepsilon_s \cdot d_p} \cdot D_{m,i} \cdot \left(\frac{u_{int} \cdot d_p}{D_{m,i}} \right)^{\frac{1}{3}} \quad (43)$$

Hierbei ist $D_{m,i}$ der molekulare Diffusionskoeffizient der Komponente i. Dieser kann, sofern er nicht bekannt ist, ebenfalls berechnet werden. Für die Diffusion in Flüssigkeiten gilt die Stokes-Einstein Beziehung:

$$D_{m,i} = \frac{k_B \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot R_{0,i}} \quad (44)$$

Dabei ist k_B die Boltzmann-Konstante, T die Temperatur und $R_{0,i}$ der hydrodynamische Radius der Komponente i. Letzterer kann mit Formel (45) berechnet werden:

$$R_0 = \left(\frac{3 \cdot \bar{V}_l}{4 \cdot \pi \cdot N_A} \right)^{\frac{1}{3}} \quad (45)$$

Hierbei ist N_A die Avogadrokonstante und \bar{V} das molare Volumen. Young et. al. setzen hierfür $0,73 \text{ cm}^3/\text{g}$ ein. Sie haben weiterhin Gleichung (45) in Gleichung (44) eingefügt, alle Vorfaktoren zusammengefasst und an ihre Ergebnisse angepasst. Damit erhalten sie [Young 1980]:

$$D_{m,i} = 8,34 \cdot 10^{-10} \cdot \frac{T}{\eta \cdot M_i^{\frac{1}{3}}} \quad (46)$$

Bei der Verwendung dieser Gleichung ist das zu Grunde liegende Einheitensystem zu beachten. Young et. al. verwenden das CGS-System (Zentimeter – Gramm – Sekunde) und rechnen beim Druck weiterhin mit Centipoise. Der Vorfaktor ist daher entsprechend des eigenen verwendeten Systems zu korrigieren.

3.2.4 Porendiffusion

Für den Porendiffusionskoeffizienten haben Carta und Jungbauer folgende Korrelation vorgeschlagen [Carta 2010]:

$$D_{p,i} = \frac{\varepsilon_{p,i} \cdot D_{m,i}}{\tau_i} \cdot \psi_{p,i} \quad (47)$$

τ_i ist hier der Tortuositätsfaktor, auch Labyrinthfaktor genannt. Damit soll die zufällige Verteilung der Poren und die damit einhergehenden, ungleichmäßigen Diffusionswege beschrieben werden. Carta und Jungbauer

geben für Proteine einen Wert zwischen 1,5 und 4 an und schlagen eine experimentelle Bestimmung unter nichtbindenden Bedingungen vor. Für IgG findet sich in der Literatur häufig ein Wert von 1,5 bis 2,5 [Carta 2010, McCoy 1996].

$\psi_{p,i}$ ist der diffusive Hinderungskoeffizient. Für dessen Berechnung ist das Verhältnis von Proteinradius zu Porenradius $\lambda_{m,i}$ ausschlaggebend [Carta 2010]:

$$\lambda_{m,i} = \frac{R_{0,i}}{r_{Pore}} \quad (48)$$

Für $\lambda_{m,i} < 0,2$ gilt:

$$\psi_{p,i} = \left(1 + \frac{9}{8} \lambda_{m,i} \cdot \ln(\lambda_{m,i}) - 1,539 \cdot \lambda_{m,i} \right) \quad (49)$$

Für $\lambda_{m,i} > 0,2$ gilt:

$$\psi_{p,i} = 0,865(1 - \lambda_{m,i})^2 \cdot (1 - 2,1044 \cdot \lambda_{m,i} + 2,089 \cdot \lambda_{m,i}^3 - 0,984 \cdot \lambda_{m,i}^5) \quad (50)$$

Damit wäre die Porendiffusion theoretisch ausrechenbar. Dem gegenüber stehen jedoch einige Unwägbarkeiten:

- Der Labyrinthfaktor kann nicht berechnet, sondern muss experimentell bestimmt werden
- Die Bestimmung muss unter nicht bindenden Bedingungen erfolgen, was den Einsatz des Zielmoleküls zur Bestimmung erschwert.
- Das Porensystem unterliegt stetigen Schwankungen. An den Wänden adsorbierte Moleküle ändern den Porenradius ebenso wie die Liganden selbst. Bei letzteren ist ein Zusammenhang der Bindungskettenlänge z.B. vom Salzgehalt bei sogenannten Tentakelstrukturen bekannt [Thomas 2013].
- Wechselwirkungen, vor allem abstoßende elektrostatische Kräfte, die das Eindringen eines Proteins trotz ausreichend großem Porenradius verhindern, werden nicht berücksichtigt.

Daher wird in dieser Arbeit nicht der Labyrinthfaktor, sondern gleich der Porendiffusionskoeffizient experimentell bestimmt. Hierfür wird eine Probe des Zielmoleküls unter nicht bindenden Bedingungen in eine Testsäule injiziert.

Das Unterbinden einer Bindung kann bei den hier verwendeten Ionenaustausch- bzw. Hydrophoben Interaktions- Adsorbentien über den Salzgehalt eingestellt werden.

Da alle anderen Parameter, wie vorhergehend beschrieben wurde, eindeutig bestimmt sind, ist die Abweichung der simulierten von den experimentellen Verläufen nur vom Porendiffusionskoeffizient abhängig. Dieser kann somit z.B. iterativ aus den Messwerten bestimmt werden.

3.2.5 Adsorptionsgleichgewicht

Zur experimentellen Bestimmung des Adsorptionsgleichgewichts stehen viele Möglichkeiten zur Verfügung [Ahuja 2000, Cavazzini 2003, Guiochon 2006, Samuelsson 2009, Seidel-Morgenstern 2004]. Einige weit verbreitete sind:

- Schüttelversuche [Camperi 1999, Desta 2013, Lan 2001]
- Peakform Analysen [Dose 2002, Felinger 2003, Guiochon 2006, Jönsson 1987, Seidel-Morgenstern 2004]
- Durchbruchkurven bzw. Frontalanalysen [Cavazzini 2003, Jacobson 1987, Seidel-Morgenstern 2004]
- Perturbation [Blümel 1998, Helfferich 1964, Mhlbachler 2002, Muralidharan 1997, Seidel-Morgenstern 2004]
- Elution am charakteristischen Punkt [Ravald 2001, Samuelsson 2008]
- H-root [Chen 1989, Helfferich 1991, Jen 1994, Lapizco-Encinas 2005]

Die Wahl der Messmethode richtet sich nach dem zeitlichen Aufwand, dem Feedbedarf und teilweise nach dem verwendeten Adsorbens. Zu beachten ist hierbei, dass bei der Verwendung eines Gradienten die Abhängigkeit der Isothermenparameter von der Elutionsstärke, z.B. der Salzkonzentration, berücksichtigt werden muss.

In dieser Arbeit werden Ergebnisse aus Schüttelversuchen, Frontalanalysen und Perturbationsversuchen verwendet. Auf eine weitreichende Herleitung und Erklärung der zu Grunde liegenden Theorien wird an dieser Stelle verzichtet, da sie in der oben angegebenen Literatur umfangreich zu finden sind. Wie bereits erwähnt wurde, liegt hier allen Gleichgewichtsbetrachtungen die Annahme einer Langmuir-Isotherme bzw. um einen linearen Term erweiterten Langmuir-Isotherme zu Grunde (HIC).

Schüttelversuche

Schüttelversuche bieten die Möglichkeit, das Adsorptionsgleichgewicht entkoppelt von der Fluidodynamik und dem Stofftransport zu betrachten. Dies unterscheidet sie maßgeblich von den anderen genannten Methoden. Zur Bestimmung eines Punktes auf der Isotherme wird eine bestimmte Menge Feed bekannter Konzentration mit einer bestimmten Menge Adsorber in Kontakt gebracht und anschließend auf einer Schüttelplatte oder ähnlichem über längere Zeit geschüttelt. Die Zeit hängt von der Geschwindigkeit der Gleichgewichtseinstellung und der Haltbarkeit der Proben ab. Sie liegt meistens bei mehreren Stunden. Eine möglichst lange Verweilzeit ermöglicht hierbei eine vollständige Diffusion der Probenmoleküle in das Porensystem des Adsorbers und eine vollständige Gleichgewichtseinstellung. Anschließend wird eine Probe aus dem Flüssigkeitsüberstand genommen und analysiert. Die gemessene Konzentration entspricht der Gleichgewichtskonzentration. Die Differenz zwischen Feed- und Gleichgewichtskonzentration ergibt, bei bekanntem Feedvolumen V_{Feed} , die adsorbierte Masse. Hieraus lässt sich bei bekanntem Adsorbervolumen V_{Ads} direkt die Beladung berechnen [Seidel-Morgenstern 2004]:

$$q_i = \frac{(c_{Feed,i} - c_{GGW,i}) \cdot V_{Feed}}{V_{Ads}} \quad (51)$$

Die Differenz zwischen Feed- und Gleichgewichtskonzentration kann auch zum Teil auf einem Zerfall des Zielmoleküls, einer Bindung an den Gefäßwänden oder ähnlichem beruhen. Daher sollte in einem zweiten Schritt eine Elution der Komponente vom Adsorber erfolgen. Hierzu wird zunächst die verbleibende Flüssigkeit aus dem Behälter mit dem Adsorber entfernt. Anschließend wird Elutionsmittel hinzugegeben und erneut über einen längeren Zeitraum geschüttelt. Danach wird die Konzentration der Zielkomponenten im Elutionsmittel bestimmt. Analog zu Formel (51) kann so auf die ehemals vorhandene Beladung zurückgerechnet werden. Die Differenz der beiden berechneten Beladungen sollte nicht mehr als 5% betragen. Gegebenenfalls ist zwischen dem Beladungsversuch und dem Elutionsversuch noch ein Waschschrift einzufügen.

Mit diesem Vorgehen ist ein Punkt auf der Isotherme bestimmt. In der Regel werden 5-10 Punkte unterschiedlicher Konzentration benötigt um sowohl die Anfangssteigung als auch den Sättigungsbereich am Ende mit hinreichend kleinem Fehler bestimmen zu können.

Dieses Vorgehen ergibt eine Isotherme für eine Eluenten-Konzentration. Solange die Chromatographie nicht isokratisch gefahren wird, ist weiterhin der Einfluss des Elutionsmittels zu untersuchen. Dafür müssen weitere Isothermen aufgenommen werden. Für Ionenaustausch oder Hydrophobe Interaktions-Adsorbentien sollten mindestens 5 Salzkonzentrationen betrachtet werden. Daraus ergeben sich ein verhältnismäßig hoher analytischer Aufwand und ein relativ hoher Zeitbedarf. In Kapitel 3.3.4.2 wird auf den Ablauf der einzelnen Messungen genauer eingegangen.

Die Abhängigkeit der maximalen Beladung q_{\max} von der Salzkonzentration wird als linear angenommen und über Gleichung (52) berücksichtigt:

$$q_{\max,i} = a_{1,i} \cdot c_{\text{Salz}} + a_{2,i} \quad (52)$$

Die Salzabhängigkeit des Henry-Koeffizienten H_i folgt häufig eher einem Potenzansatz, wie er in Gleichung (53) dargestellt ist:

$$H_i = b_{1,i} \cdot c_{\text{Salz}}^{b_{2,i}} \quad (53)$$

Dem hohen zeitlichen und analytischen Aufwand steht ein geringer Feed und Adsorbensbedarf positiv gegenüber. Schüttelversuche können, theoretisch, bis in den Mikroliter Maßstab verkleinert werden. Sie werden daher häufig für High Throughput Versuche verwendet [Nfor 2010]. Hier ist allerdings eine genaue Fehlerrechnung anzuraten. Die Einzelfehler z.B. der Pumpen und die Genauigkeit der Analytik führen im sehr kleinen Maßstab über das Fehlerfortpflanzungsgesetz schnell zu großen Gesamtfehlern.

Frontalanalyse

Für die Frontalanalyse wird eine Durchbruchskurve durch eine gepackte Säule gefahren. Diese wird vorher mit dem Laufmittel equilibriert. Zum Zeitpunkt $t=0$ beginnt die Zugabe von Feed. Am Säulenausgang entsteht der in Abbildung 23 gezeigte Konzentrationsverlauf. In diesem Beispiel ist nur eine Komponente im System vorhanden.

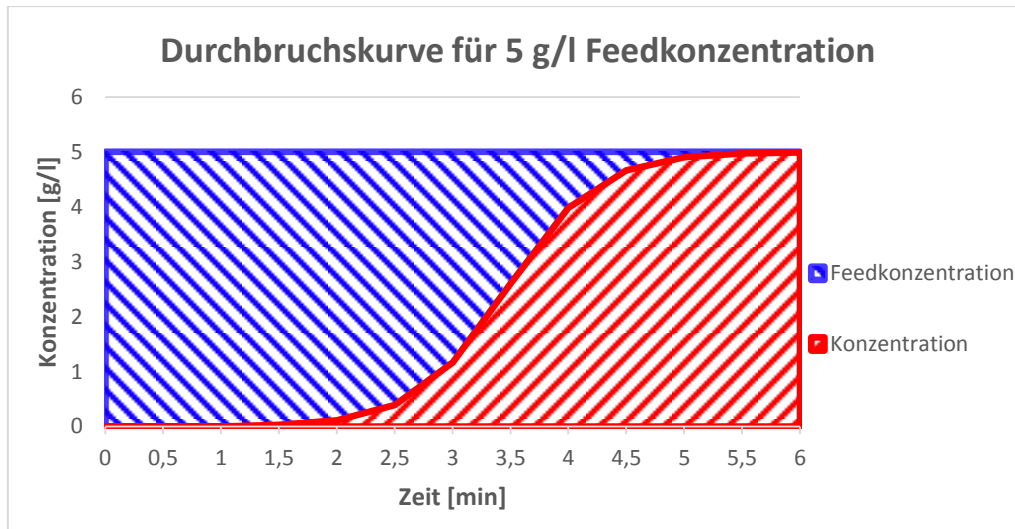


Abbildung 23: Beispiel einer Durchbruchskurve für 5 g/l Feedkonzentration.

Aus dem gemessenen Signal am Kolonnenausgang kann auf die Beladung geschlossen werden. Diese ist proportional zur blau schraffierten Fläche in Abbildung 23. Die Integration des Signals zur Ermittlung der Fläche kann durch die Verwendung der mittleren Verweilzeit vereinfacht werden. Es gilt Formel (54) [Cavazzini 2003]:

$$q_i = \frac{(\bar{t}_i - t_0) \cdot \dot{V} \cdot c_{Feed,i}}{V_{Ads}} \quad (54)$$

Analog zu Schüttelversuchen müssen mehrere Durchbruchskurven pro Isotherme und mehrere Isothermen für den gesamten Elutions-Konzentrationsbereich gemessen werden.

Sofern mehr als eine Komponente vorhanden ist, verkompliziert sich die Methode. Dies liegt nicht zuletzt daran, dass nicht unbedingt für jede Komponente der Durchbruch genau detektiert werden kann. In vielen Fällen werden zwei Sigmoidale Kurven mit unterschiedlichen Plateaus gemessen. Dann ist keine zusätzliche Analytik notwendig. Dies ist einer der Vorteile gegenüber Schüttelversuchen. Ist die Detektion beider Kurven nicht möglich, so muss der gesamte Durchbruch fraktioniert und über eine sekundäre Analytik quantifiziert werden [Jacobson 1987].

Der zweite Vorteil von Durchbruchskurven liegt in kurzen Messzeiten. Durchbruchskurven werden im Bereich von Minuten gefahren statt Stunden bei Schüttelversuchen. Dies kann bei sehr sensiblen Proben ein wichtiges Kriterium sein. Demgegenüber steht jedoch ein deutlich höherer

Materialbedarf im Vergleich zu Schüttelversuchen. Zum einen muss eine gut gepackte Säule verwendet werden. Daher kann ein Mindestmaß an Adsorbens nicht unterschritten werden. Zum anderen geht, gerade bei langgezogenem S-förmigen Verlauf, viel Feed verloren. Diese Menge entspricht der rot schraffierten Fläche in Abbildung 23.

Der Feedbedarf kann durch das Staffeln von Durchbruchversuchen verringert werden. Dazu wird mit geringer Konzentration angefangen und ein Versuch durchgeführt, bis die Gleichgewichtskonzentration erreicht ist. Anschließend wird die Feedkonzentration auf das nächste Niveau angehoben. Die Beladung des ersten Durchbruchs bleibt auf der Säule, so dass bis zum Erreichen des nächsten Plateaus nur die Differenzmenge beladen werden muss. Die Beladung dieser Stufe errechnet sich nach [Seidel-Morgenstern 2004]:

$$q_i(c_{Feed,i}) = q_i^{init} + \frac{(\bar{t}_i - t_0) \cdot \dot{V} \cdot (c_{Feed,i} - c_i^{init})}{V_{Ads}} \quad (55)$$

Hierbei ist q_i^{init} bzw. c_i^{init} die Beladung respektive Konzentration des vorherigen Plateaus.

Perturbation

Die Perturbation ist eine Methode, bei der nicht direkt die Beladung q_i der stationären Phase bestimmt wird. Vielmehr wird, ausgehend von der Gleichgewichtstheorie, die Wanderungsgeschwindigkeit einer Gleichgewichtsstörung mit der Isotherme in Verbindung gebracht. Dazu wird zunächst eine Chromatographiesäule mit konstanter Feedkonzentration bis zum Erreichen des Gleichgewichtszustandes beladen. Dieser Zustand wird durch Kreislaufförderung beibehalten. Nun wird ein kleiner Peak des Eluenten oder einer der beteiligten Komponenten als Reinstoff injiziert. Dies bringt das System aus dem Gleichgewicht. Die Gleichgewichtsstörungen wandern entlang der Säule und können als positiver oder negativer Peak am Säulenausgang detektiert werden. Es entstehen so viele Peaks, wie Komponenten im System vorhanden sind, wobei der Eluent selbst als Komponente zu betrachten ist. Letzterer eluiert mit der Totzeit t_0 . Alle anderen eluieren laut Gleichgewichtstheorie entsprechend Gleichung (7), welche bereits bei der SMB Auslegung Verwendung fand:

$$t_{th,i} = t_0 \cdot \left(1 + \frac{1 - \varepsilon_t}{\varepsilon_t} \cdot \frac{dq_i}{dc_i} \bigg|_{\bar{c}} \right) \quad (7)$$

Bei korrekten Isothermenparametern dürfte keine Abweichung zwischen den theoretischen und gemessenen Verweilzeiten bestehen. Umgekehrt können durch Minimierung der kleinsten Fehlerquadrate die Isothermenparameter über die gemessenen Verweilzeiten bestimmt werden.

Die Isotherme ist in Gleichung (7) im totalen Differential enthalten. Dieses kann für eine Komponente direkt bestimmt werden. Für mehrere Komponenten geht das nicht. Hier gilt [Mihlbachler 2002]:

$$\frac{dq_i}{dc_i} = \sum_j^N \frac{\partial q_i}{\partial c_j} \cdot \frac{dc_j}{dc_i} \quad (56)$$

Für ein binäres Gemischt erhält man so [Muralidharan 1997]:

$$\frac{dq_1}{dc_1} = \frac{\partial q_1}{\partial c_1} + \frac{\partial q_1}{\partial c_2} \cdot \frac{dc_2}{dc_1} \quad (57)$$

$$\frac{dq_2}{dc_2} = \frac{\partial q_2}{\partial c_2} + \frac{\partial q_2}{\partial c_1} \cdot \frac{dc_1}{dc_2} \quad (58)$$

Dabei sind alle Terme direkt aus der Isothermengleichung (26) ableitbar, bis auf $\frac{dc_j}{dc_i}$. Hierfür gilt entsprechend der Wellentheorie [Helfferrich 1993] und der Kohärenzbedingung [Helfferrich 1996, Jen 1992] für ein Zwei-Komponenten System [Muralidharan 1997]:

$$\frac{\partial q_2}{\partial c_1} \cdot \left(\frac{dc_1}{dc_2}\right)^2 + \left(\frac{\partial q_2}{\partial c_2} - \frac{\partial q_1}{\partial c_1}\right) \cdot \frac{dc_1}{dc_2} - \frac{\partial q_1}{\partial c_2} = 0 \quad (59)$$

Diese quadratische Gleichung enthält zwei Lösungen, von der je eine in Gleichung (57) und die andere in Gleichung (58) eingesetzt wird. Dabei ist auf die Indexkonvention zu achten. Bei konsistenter Verwendung der Indices und Einsetzen der Gleichung (57) bzw. (58) in Gleichung (7) ergibt sich für die schneller wandernde Komponente auch die niedrigere Verweilzeit. Für ein System höherer Ordnung lassen sich analog zu Formel (59) Gleichungen höherer Ordnung aufstellen.

Die Parameter der Isotherme werden nun durch die Minimierung der kleinsten Fehlerquadrate zwischen gemessener und berechneter Verweilzeit unter Veränderung der Isothermenparameter aller beteiligten Komponenten bestimmt. Dies setzt voraus, dass das Gleichgewichtssystem sich überhaupt mit dem vorher definierten Modell, z.B. Langmuir, beschreiben lässt.

Der Vorteil dieser Messmethode liegt im sehr geringen zeitlichen Aufwand. Dieser ist auch darauf zurückzuführen, dass keine weitere Analytik erforderlich ist, sofern die Peaks der Gleichgewichtsstörung detektierbar sind. Weiterhin lässt sich die Methode gut automatisieren.

Wie auch bei der Frontalanalyse ist der Feedbedarf sehr groß. Es müssen ebenfalls mehrere Perturbationen gefahren werden, um den Einfluss der Gleichgewichts- bzw. Modifier-Konzentration zu erfassen. Da zum Erreichen des Gleichgewichtszustandes eine Durchbruchskurve gefahren werden muss, empfiehlt es sich, diese jeweils als Frontalanalyse auszuwerten.

3.3 Material und Methoden

3.3.1 Laufmittel, Testsubstanzen und Chromatographie-Materialien

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle verwendeten Salze zur Herstellung der Puffer in Analysequalität von Merck (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) bezogen. Das zur Herstellung von Puffern verwendete Wasser stammt aus einer Arium[®] Pro Laborwasser Anlage (Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG, Göttingen, Deutschland). Alle Versuche mit Ionenaustausch- oder Hydrophoben Interaktionsmedien wurden in 20 mM NaPi Puffer bei einem pH Wert zwischen 5,0 und 6,0 durchgeführt. Die Einstellung der Elutions- respektive Bindungsstärke erfolgte mit Ammoniumsulfat.

Als Ionenaustausch Medium wurde Fractogel[®] EMD SO₃⁻ (S) und als HIC Medium Fractogel[®] EMD Phenyl (S) von Merck verwendet. Es wurden sowohl vorgepackte 1 ml Säulen der Firma Atoll (5-50, Atoll GmbH, Weingarten, Deutschland) benutzt als auch selbstgepackte Glassäulen des Typs Superformance[®] 300-10 (Götec-Labortechnik GmbH, Bickenbach, Deutschland). Letztere waren auf 10 cm Betthöhe gepackt. Um diese fluiddynamisch charakterisieren zu können, kamen teilweise selbstgedrehte Stempel zum Einsatz.

Die verwendeten Membranadsorber waren vom Typ Sartobind[®] S (IEX) und Sartobind[®] Phenyl (HIC) in der 3 ml nano Größe von Sartorius (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Deutschland).

Da alle Versuche zur Modellierung parallel für Ionenaustausch und Hydrophobe Interactions- Partikel und Membrane durchgeführt wurden, wird

im Folgenden nicht zwischen den Versuchen unterschieden, sofern es nicht explizit anders beschrieben wird.

Als zu trennendes Gemisch kamen bei IEX/HIC Versuchen zwei Zellkultur Brühen aus zwei verschiedenen industriellen Chinese Hamster Ovary (CHO) Zelllinien zum Einsatz. Diese wurden in Haus fermentiert und enthielten den monoklonalen Antikörper Immunglobulin G (IgG) als Zielkomponente [Gronemeyer 2017]. Die Fermentationsbrühen wurden nach der Zentrifugation mittels Diafiltration auf den Chromatographiepuffer umgepuffert und teilweise auf die gewünschte Konzentration aufkonzentriert. Hierfür wurde ein SARTOFLOW[®] Slice 200 Benchtop System mit Sartacon[®] Slice 200 Hydrosart[®] 10 kDa Membranen verwendet (Sartorius Stedim Biotech GmbH).

Normalphasen Chromatographie wurde auf LiChroprep[®] SI 60 Material (15 – 25 µm, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) in Superformance[®] 600-16 Säulen betrieben. Alle Chromatographieläufe waren isokratisch mit 85 %-vol. Hexan (LiChrosolv[®], Merck KGaA) und 15 %-vol. Ethylacetat (LiChrosolv[®], Merck KGaA). Als Testsubstanz wurde ein Gemisch aus Cyclopentanon (Reinheit 99%) und Cycloheptanon (Reinheit 98%) verwendet (Alfa Aesar, Haverhill, MA, USA).

3.3.2 Anlagen und Apparate

Für die chromatographischen, nicht analytischen Versuche bis 5 ml/min wurden drei VWR-Hitachi LaChrom Elite[®] Anlagen (VWR International, Radnor, PA, USA) mit quaternären Niederdruck Gradientenpumpen L-2130 und L-2200 Autosamplern benutzt. Zwei Anlagen verfügten über einen L-2455 Dioden Array Detector (DAD), die andere über einen L-2400 UV Detektor. Als weitere Detektoren waren ein Brechungsindex- (L-2490) und ein pH/Leitfähigkeitsdetektor (pH/C-900, General Electric, Bosten MA, USA) vorhanden. Bei den zwei an sich baugleichen LaChrom Elite[®] Anlagen besteht der Unterschied in der Ausführung. Eine ist biokompatibel, die andere lösemittelbeständig ausgeführt.

Für Messungen mit Volumenströmen über 5 ml/min kam eine LaPrep[®] Anlagen zum Einsatz (VWR International, Radnor, PA, USA). Diese bestand aus zwei P110 Pumpen und einem P314 UV Detektor. Zusätzlich waren eine aktive Mischkammer sowie ein Smartline 3900 Autosampler von Knauer

vorhanden. Als pH/Leitfähigkeitsdetektor war ebenfalls ein pH/C-900 von GE verbaut.

Zusätzlich kamen P-130 Feedpumpen sowie P-202 bzw. P-206 Schaltventile zum Einsatz. Alle Geräte werden von VWR (VWR International, Radnor, PA, USA) vertrieben.

Zum Fraktionieren von Proben nach dem Durchlauf durch die Chromatographieranlagen kamen zwei Foxy Jr. (Teledyne Isco, Lincoln, NE, USA) zum Einsatz.

Für die analytischen Größenausschluss bzw. Protein A Messungen wurden teilweise die VWR-Hitachi Anlagen benutzt, größtenteils jedoch zwei HPLC Systeme der 1100 Serie von Agilent (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Diese bestehen jeweils aus einer Pumpe, einem Autosampler, einem Säulenofen und einem DAD der 1100 Serie.

3.3.3 Analytik

3.3.3.1 *Protein A Chromatographie*

Als Säulen wurden PA ID Poros[®] Sensor Cartridges (2,1 x 30, Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) verwendet. Der Bindungspuffer bestand aus Dulbecco's PBS Puffer (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA) mit einem pH Wert von 7,4. Dieser wurde zur Elution auf pH 2,6 abgesenkt. Die Flussrate betrug 1,6 ml/min. Kalibriert wurde über die Peakfläche des Chromatogramms der UV Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm.

3.3.3.2 *Größenausschluss Chromatographie (SEC)*

Bei der Größenausschluss Chromatographie handelt es sich um eine isokratische Methode. Als Puffer wurde 0,1 M NaPi Puffer mit 0,1 M Natriumsulfat verwendet. Die Flussrate richtete sich nach der verwendeten Säule. Es kamen Tosoh TSKgel G3000SWXL (5 µm, 7,8 x 300, Tosoh Bioscience GmbH, Darmstadt, Deutschland) und Yarra SEC-3000 (3 µm, Phenomenex Inc. Torrance, CA, USA) zum Einsatz. Die Yarra SEC-3000 wurden in den Abmessungen 7,8 x 300 und 4,6 x 300 verwendet. Bei einem Durchmesser von 7,6 mm wurden 1 ml/min als Volumenstrom gefördert, bei 4,6 mm wurde der Volumenstrom auf 0,35 ml/min reduziert. Zudem wurden SecurityGuard Vorsäulen (GFC 3000, 4 x 3, Phenomenex) verwendet. Die UV

Messungen wurden bei Wellenlängen von 220 nm, 240 nm, 260 nm und 280 nm durchgeführt.

3.3.3.3 *Normalphasen Chromatographie*

Analog zu den selbstgepackten SI 60 Säulen wurden für die Analytik der Cyclopentanon /Cycloheptanon Proben auch Säulen mit LiChroprep® Si 60 Säulenmaterial verwendet (HiBar, 15-25 µm, 4 x 250, VWR). Die isokratische Methode wurde mit Hexan / Ethylacetat (85:15 v/v, LiChrosolv®, Merck KGaA) als Eluent gefahren. Die UV Extinktion wurde bei 280 nm gemessen. Der Volumenstrom betrug 1 ml/min.

3.3.4 Modellparameter Bestimmung

3.3.4.1 *Lückengrad, Porosität und axialer Dispersionskoeffizient*

Zur Bestimmung des Lückengrades bzw. der Porosität und des axialen Dispersionskoeffizienten der IEX/HIC Medien wurden Tracer unterschiedlicher Größe verwendet. Zur Bestimmung der totalen Porosität wurde Aceton (LiChrosolv®, Merck KGaA) und NaCl (Merck KGaA) verwendet. Beide Substanzen durchdringen das Porensystem vollständig. Aceton wurde mit den UV Detektoren bei 254 nm detektiert, NaCl mit dem Leitfähigkeitsdetektor. Die molekülgrößenabhängige Porosität wurde mit Dextranen und Pullulanen untersucht. Als Dextrane kamen analytische Standards in den Molekülgrößen 1 kDa; 5 kDa; 12 kDa; 25 kDa; 50 kDa; 80 kDa; 150 kDa; 270 kDa und 670 kDa zum Einsatz (Fluka / Sigma-Aldrich, St.Louis, Mo, USA). Die Pullulan-Standards stammten aus einem PSS-Testkit mit den Molekülgrößen 342 Da; 1080 Da; 6,1 kDa; 9,6 kDa; 21,1 kDa; 47,1 kDa; 107 kDa; 194 kDa; 337 kDa und 708 kDa (PSS-Polymer Standards Service GmbH, Mainz, Deutschland). Zur Detektion wurden UV-Messungen bei 220 nm bzw. RI Messungen verwendet.

Um den Einfluss der Strömungsgeschwindigkeit auf die Messung der Porosität ausschließen zu können bzw. selbigen Einfluss für die axiale Dispersion zu bestimmen, wurden für die partikuläre Chromatographie unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeiten gefahren. Dies waren 10 cm/h und 100 cm/h. Das entspricht bei Glassäulen mit einem Zentimeter Innendurchmesser einem Volumenstrom von 0,131 ml/min und 1,31 ml/min. Zusätzlich wurden einzelne Versuche bei 0,1 ml/min, 0,5 ml/min, 1 ml/min und 2 ml/min durchgeführt. Die letzten beiden Strömungsgeschwindigkeiten wurden zudem mit IgG unter nicht

bindenden Bedingungen gefahren. Dies ist jedoch nur für das Ionenaustauschmedium möglich, da es bei der hydrophoben Interaktionschromatographie immer zu einer gewissen Retention kommt.

Für Membranadsorber wurden die Messreihen mit allen Molekülgrößen bei 1 CV/min, 3 CV/min und 5 CV/min gefahren. Dies entspricht für 3 ml Nano Module 3 ml/min, 9 ml/min und 15 ml/min. Zudem wurden für den kleinsten Tracer Versuche mit 0,5 ml/min durchgeführt.

Als Tracer für Säulen mit LiChroprep® SI 60 wurde Toluol verwendet. Da die zur Trennung vorgesehenen Substanzen ähnliche Molekülgrößen haben wie Toluol, wurde auf die Messung mit unterschiedlichen Molekülgrößen verzichtet. Der Volumenstrom lag bei 5 ml/min.

Die im Detektionssignal abzulesenden Zeiten entsprechen der Gesamtverweilzeit in der Anlage. Gesucht waren nur die Verweilzeiten innerhalb der Säule. Alle Messungen wurden daher einmal mit und einmal ohne Säule durchgeführt, um die Anlagentotzeit von der Gesamtverweilzeit abziehen zu können.

3.3.4.2 Schüttelversuche

Es standen nur verhältnismäßig geringe Mengen an IgG Brühe zur Verfügung. Daher kamen zur Messung der Isothermen für die partikulären Chromatographiemedien und die Membranadsorber nur Schüttelversuche in Frage. Eine Fehlerrechnung hat gezeigt, dass mindestens 100 µl stationäre Phase verwendet werden müssen, um den Messfehler kleiner 5% zu halten. Verwendet wurden daher pro Schüttelkolben 250 µl Fractogel® SO₃⁻ (S) bzw. Fractogel® EMD Phenyl (S) respektive Membrandstanzlinge mit einem Durchmesser von 13 mm.

Der IgG Titer der Fermentationsbrühen war starken Schwankungen unterlegen. Die Feedbrühe wurde daher entweder per Ultrafiltration (Cuttoff 10 kDa) auf eine IgG Konzentration von 5 g/l aufkonzentriert oder mittels Pufferzugabe auf diesen Wert verdünnt. Die Nebenkonzentration schwankte ebenfalls von Zellernte zu Zellernte. Im Mittel lag sie nach dem Aufkonzentrieren/Verdünnen bei 1 g/l.

Um den Einfluss der Salzstärke auf die Isothermen zu bestimmen, wurde das Feed Gemisch mittels Diafiltration auf Puffer mit dem entsprechenden Salzgehalt umgepuffert. Für die Ionenaustauscher wurden 0,02 M; 0,05 M; 0,1

M; 0,15 M; 0,2 M und 0,3 M Ammoniumsulfat bei einem pH-Wert von 6,0 untersucht. Für HIC Partikel oder Membrane wurden 0,2 M; 0,4 M; 0,6 M; 0,8 M und 1 M Ammoniumsulfat, ebenfalls bei pH 6,0 verwendet.

Pro Salzkonzentration wurden fünf Messpunkte gemessen. Für Schüttelversuche mit Adsorbenspartikeln wurde jeweils 1 ml; 2 ml; 5 ml; 10 ml oder 25 ml Feedbrühe verwendet. Diese wurden in Zentrifugenvials vorgelegt. Das Gesamtvolumen wurde anschließend mit Puffer der entsprechenden Salzkonzentration auf 25 ml aufgefüllt.

Für Schüttelversuche mit Membranadsorbern wurde 6 ml Gesamtvolumen verwendet. Die einzelnen Messpunkte wurden mit 1 ml, 2 ml, 3 ml, 5 ml und 6 ml Feedbrühe erzeugt.

Aus jedem Vial wurde anschließend 1 ml Rückstellprobe entnommen. Diese Proben wurden unter gleichen Bedingungen wie die eigentlichen Messungen mitgeschüttelt und erlaubten die Berücksichtigung von Produktdegeneration auf das Messergebnis.

Zu den nun 24 ml bzw. 5 ml Feedvolumen wurden 250 µl Adsorbens respektive 13 mm Membranstanzlinge hinzugefügt und für 16 Stunden bei 120 RPM auf einem Schütteltisch geschüttelt.

Danach wurde die stationäre Phase entfernt. Membranstanzlinge konnten per Pinzette entnommen werden, Adsorbensproben wurden bei 1500 xg zentrifugiert. Aus dem Überstand wurden 2 ml Probe entnommen, je 1 ml für die Protein A und die SEC Analytik. Der restliche Überstand wurde abdekantiert.

Als Waschschrift wurden 15 ml bzw. 5 ml des Bindungspuffers der entsprechenden Salzstärke hinzugefügt und für zwei Stunden geschüttelt. Es folgte eine erneute Zentrifugation, Probennahme und Dekantation.

Dieser Schritt wird mit Elutionspuffer (IEX: 1 M Ammoniumsulfat; HIC: 0 M Ammoniumsulfat) wiederholt. Die Schüttelzeit beträgt dabei vier Stunden.

3.3.4.3 Frontal Analysen und Perturbationen

Frontalanalysen und Perturbationen wurden für das Gemisch Cyclopentanon / Cycloheptanon auf LiChroprep® SI 60 Material durchgeführt. Als Eluent wurde ein Gemisch aus 85 vol-% Hexan und 15 vol-% Ethylacetat verwendet. Der

Volumenstrom betrug 12,5 ml/min. Das Adsorbens war in Götec Glassäulen mit 1,6 cm Innendurchmesser auf einer Länge von 10 cm gepackt.

Die Säulen wurden zunächst mit dem reinen Eluenten equilibriert. Anschließend wurde sprunghaft auf ein Gemisch aus Eluent und Zielkomponente umgeschaltet. Hierfür wurden in mehreren Messreihen die Einzelkonzentrationen 0,5 g/l; 1 g/l; 2 g/l; 4 g/l; 7,8 g/l; 31,3 g/l; 62,5 g/l und 125 g/l verwendet. Es lagen jeweils Cyclopentanone und Cycloheptanon in gleichen Massenanteilen mit der besagten Konzentration vor. Die sich aus dem Konzentrationssprung ergebende Durchbruchskurve wurde mittels Dioden Array Detektor aufgenommen und zusätzlich in sechs Sekunden Abschnitten fraktioniert. Diese Fraktionen wurden offline analysiert und als Frontal Analyse ausgewertet. Am Ende der Durchbruchskurve stellt sich ein neuer Gleichgewichtszustand ein. Wenn dieser erreicht war, wurden die Perturbationsversuche gestartet. Dazu wurde nacheinander 100 µL reiner Eluent bzw. 50 µL reines Cyclopentanone oder Cycloheptanon injiziert und die entstehenden Peaks mit dem DAD Detektor aufgezeichnet. Dies wurde jeweils zwei Mal pro Komponente durchgeführt.

3.3.5 Validierungsversuche

Für die Validierung der Fluidodynamik und des Stofftransports konnten jeweils die Totzeitmessungen der Lückengradversuche herangezogen werden (Kapitel 3.3.4.1). Für die Validierung der Isothermen bzw. die Gesamtvalidierung wurden zusätzliche Trennversuche auf den Säulen bzw. Membranadsorbern durchgeführt. Die daraus ermittelten Peaks wurden dann zur Validierung herangezogen.

Für die Ionenaustauscher- bzw. Hydrophobe Interaktionschromatographie Säulen (10x100 Glassäule) wurden dazu 99 µL Fermentationsbrühe mit einer Konzentration von 1 g/l IgG und ca. 0,2 g/l Nebenkomponekte injiziert. Es wurden Volumenströme von 1 ml/min und 2 ml/min gefahren. Die Trennung erfolgte mit unterschiedlich steilen Gradienten zwischen 1 CV und 20 CV.

Auf die Membranadsorbermodule wurden 99 µL Fermentationsbrühe injiziert. Nach der Injektion folgte ein 2 CV Waschschrift. Es wurden Gradienten mit 1 CV, 3 CV und 5 CV untersucht.

Für die Normalphasensäulen wurden 100 µL eines 50/50 w-% Gemischs aus Cyclopentanone und Cycloheptanon mit den Konzentrationen 0,5 g/l; 1 g/l; 2 g/l;

4 g/l; 7,8 g/l; 31,3 g/l und 62,5 g/l injiziert. Der Volumenstrom lag bei 12,5 ml/min.

3.4 Validierung

3.4.1 Fluidodynamik der Chromatographie-Anlagen

Die Chromatographischen Anlagen wurden, wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben wurde, simuliert. Für die praktisch baugleichen Anlagen im analytischen Maßstab wurde jeweils mit einem gesamt Totvolumen von ca. 0,11 ml gerechnet. Davon entfallen ca. 0,09 ml auf die insgesamt verbauten 190 cm Kapillaren mit 0,025 cm Innendurchmesser. Diese teilen sich auf zu 10 cm vor dem Rührkessel und je zwei mal 80 cm vor bzw. nach der Chromatographiesäule (vgl. Abbildung 19). Letztere entfällt natürlich bei Versuchen, die nur die Fluidodynamik der Anlage betreffen.

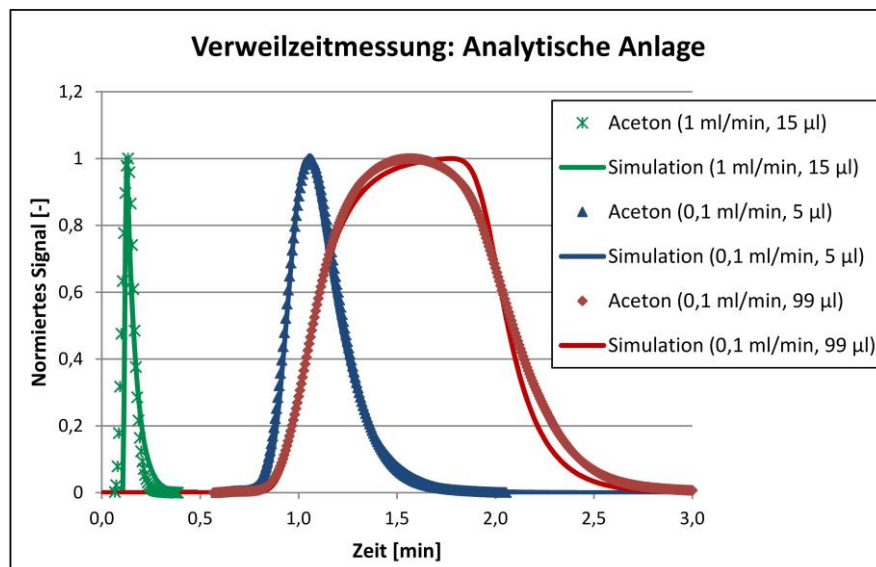


Abbildung 24: Vergleich zwischen gemessenen (Punkte) und simulierten (Linien) Verweilzeitverläufen bei unterschiedlichen Injektionsvolumina und Strömungsgeschwindigkeiten für eine analytische Chromatographie-Anlage.

Abbildung 24 zeigt den Vergleich zwischen gemessenen und simulierten Werten für unterschiedliche Bedingungen. Dabei ist zu erkennen, dass die simulierten Verläufe insgesamt gut mit den gemessenen übereinstimmen. Die relevanten Kennzahlen sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Grundsätzlich ist die Übereinstimmung der Ergebnisse für niedrige Strömungsgeschwindigkeiten größer. Bei einem Volumenstrom von 0,1 ml/min stimmen die mittleren Verweilzeiten der simulierten und gemessenen Peaks gut überein. Die Abweichung beträgt ca. 1 %, das Bestimmtheitsmaß liegt,

unabhängig von der Injektionsmenge, über 0,99. Bei höheren Fließgeschwindigkeiten nimmt die Bestimmtheit deutlich ab. Bei prozessrelevanten Volumenströmen von 1 ml/min liegt die Abweichung der mittleren Verweilzeit bei ca. 17 %. Diese große relative Abweichung hat jedoch auf die Prozesssimulationen keinen Einfluss. Absolut gesehen beträgt die Abweichung keine zwei Sekunden. Die Laufzeit der zu simulierenden Prozesse liegt dabei in Größenordnungen zwischen 10 und 90 Minuten.

Tabelle 2: Vergleichswerte zwischen gemessenen und simulierten Verweilzeitverläufen für die analytischen Anlagen:

Messreihe	Mittlere Verweilzeit			Bestimmtheitsmaß R^2 [-]
	gemessen [min]	simuliert [min]	Abweichung [%]	
Aceton (1 ml/min, 15 μ l)	0,14	0,16	-17,441	0,801
Aceton (0,1 ml/min, 5 μ l)	1,12	1,13	-0,939	0,996
Aceton (0,1 ml/min, 99 μ l)	1,62	1,60	1,294	0,993

Ein ähnliches Bild zeigt sich für die Simulation der präparativen Anlage. Diese hat insgesamt ein größeres Totvolumen von ca. 0,25 ml, was sich gerade bei niedrigen Strömungsgeschwindigkeiten in ausgeprägtem Tailing der Verweilzeitverläufe zeigt (siehe Abbildung 25).

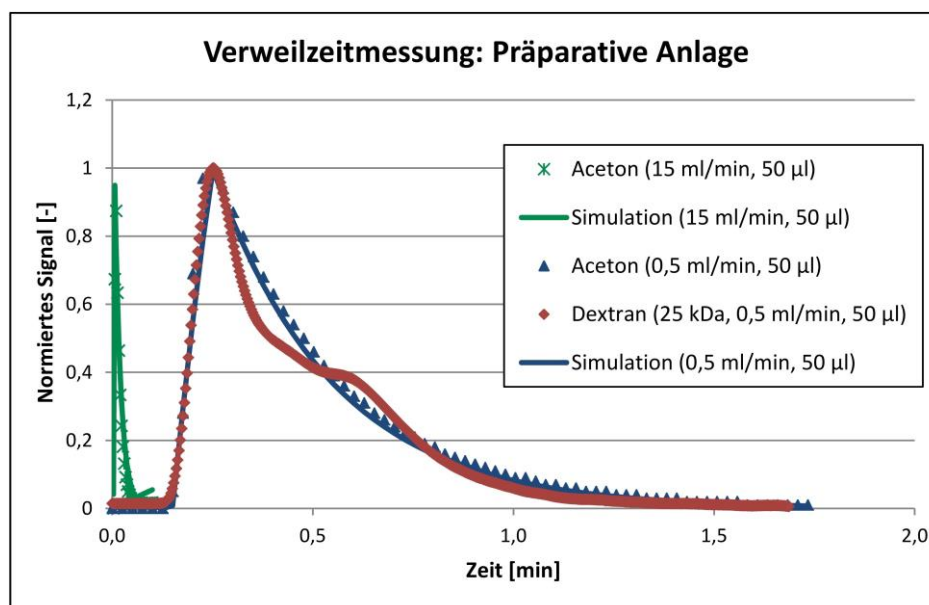


Abbildung 25: Vergleich zwischen gemessenen (Punkte) und simulierten (Linien) Verweilzeitverläufen bei unterschiedlichen Strömungsgeschwindigkeiten und unterschiedlichen Komponenten (Aceton (blau), Dextran 25 kDa (rot)) für die Anlage im präparativen Maßstab.

Für den Vergleich in Abbildung 25 sind hier beispielhaft nicht nur Verläufe von Aceton (blaue Dreiecke) dargestellt, sondern auch ein Verlauf für Dextran (rote Rauten). Dieser zeigt im Vergleich zu Aceton ein etwas anderes Verhalten. Der Grund für den zweiten Sattel ist nicht eindeutig geklärt. Es wird vermutet, dass es zu Wechselwirkungen zwischen Dextran und Teilen der Anlage kommt. Diese Problematik verstärkt sich für Dextrane größerer Molekülgrößen bis zum Auftreten eines zweiten Peaks.

Auch für die Fluidodynamik der präparativen Anlage gilt, dass diese für prozessrelevante Strömungsgeschwindigkeiten an Bedeutung verliert. Die Daten in Tabelle 3 zeigen aber auch, dass eine Modellierung mit hinreichender Genauigkeit möglich wäre.

Tabelle 3: Vergleichswerte zwischen gemessenen und simulierten Verweilzeitverläufen für die präparative Anlage:

Messreihe	Mittlere Verweilzeit			Bestimmtheitsmaß
	gemessen [min]	simuliert [min]	Abweichung [%]	R ² [-]
Aceton (15 ml/min, 5 µl)	0,02	0,03	-30,541	0,946
Aceton (0,5 ml/min, 5 µl)	0,50	0,49	1,267	0,993
Dextran (25 kDa, 0,5 ml/min, 5 µl)	0,48	0,49	-3,161	0,973

3.4.2 Ionenaustausch- und Hydrophobe Interaktions Chromatographie-Säulen

3.4.2.1 Fluidodynamik und Stofftransport

Die fluidodynamischen Versuche wurden an einer der analytischen Anlagen durchgeführt. Diese wurde für die Simulationen, wie im vorhergehenden Kapitel (3.4.1) beschrieben ist, implementiert. Die Chromatographiesäule selbst wurde mit 10 cm Festbettlänge und 1 cm Innendurchmesser in die Simulation eingepflegt. Zu beachten ist, dass die Säule selbst noch über kurze Zulauf- und Ablaufkapillaren verfügt. Diese müssen entsprechend berücksichtigt werden. Das gleiche gilt für die Simulation von Messungen, welche mittels des Brechungsindex-Detektors aufgenommen wurden. Hier ist die Länge des Kolonnenauslaufs in der Simulation entsprechend um die zusätzliche Kapillare zu verlängern.

Der mittlere Partikeldurchmesser d_p beträgt 30 µm. Die experimentelle Bestimmung des Porendiffusionskoeffizienten ergab einen Wert im Bereich

von ca. $5,54 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$. Damit hätte der Tortuositätsfaktors τ_i für IgG einen Wert von ca. 2,0. Dies stimmt gut mit Literaturdaten überein [Carta 2010, McCoy 1996]. Der Wert wurde hier für alle Simulationen verwendet. Dies ist streng genommen nicht korrekt, da unterschiedliche Proteine auch unterschiedliche Tortuositätsfaktoren haben können, jedoch war der Einfluss des Tortuositätsfaktors auf die Simulationen hier eher gering. Dies ist exemplarisch in Abbildung 26 dargestellt. Diese zeigt zwei Simulationen mit einem Faktor τ_i von 1,5 (rot) und 2,0 (blau) für IgG auf dem Ionenaustauschmedium bei einem Volumenstrom von 1,0 ml/min. Dabei ist die Abweichung der mittleren Verweilzeit für einen Tortuositätsfaktor von 2,0 bei 0,06 % bei einem Bestimmtheitsmaß von 0,988 im Vergleich zu 0,09 % und 0,976 für einen Faktor von 1,5. Ein ähnlich geringer Einfluss lässt sich auch für andere Molekülgrößen feststellen.

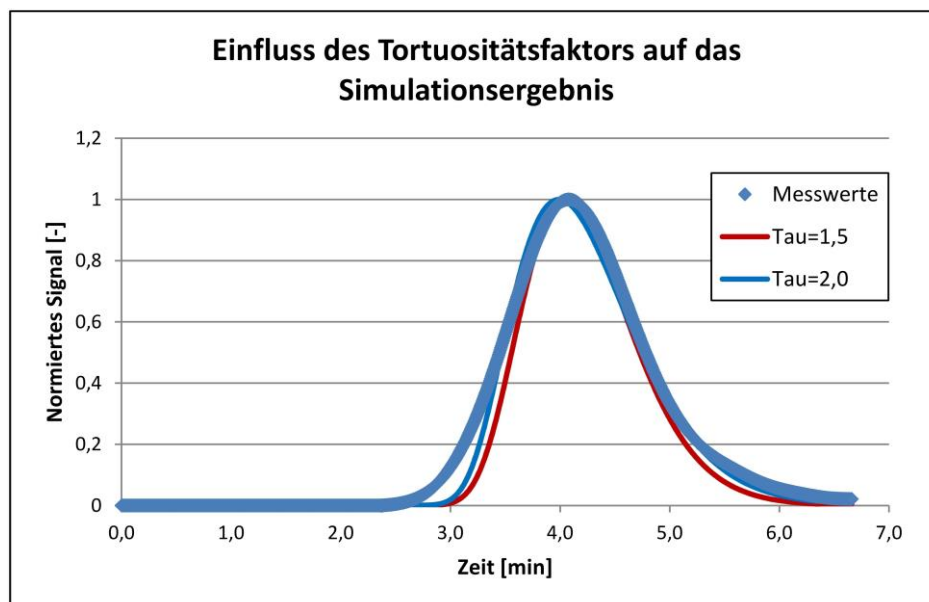


Abbildung 26: Einfluss des Tortuositätsfaktors auf das Simulationsergebnis am Beispiel von IgG auf der IEX Säule bei 1,0 ml/min.

Der geringe Einfluss des Tortuositätsfaktors könnte auf die geringen Diffusionswege in den kleinen Partikeln zurückzuführen sein. Demgegenüber steht jedoch der Einfluss des Partikeldurchmessers auf die Simulationsergebnisse selbst. Dieser ist beispielhaft für Aceton in Abbildung 27 dargestellt. Zu erkennen ist, dass eine Halbierung des Partikeldurchmessers einen wesentlichen Einfluss auf die Peakbreite hat. Der Peak ist schmaler. Das Bestimmtheitsmaß für die Simulationen mit 15 μm Partikeldurchmesser ist 0,853 im Vergleich zu 0,986 für 30 μm Partikel. Eine

Verdoppelung des Durchmessers hingegen verändert die Simulationsergebnisse kaum. Auf die mittlere Verweilzeit hat der Partikeldurchmesser hier keinen Einfluss.

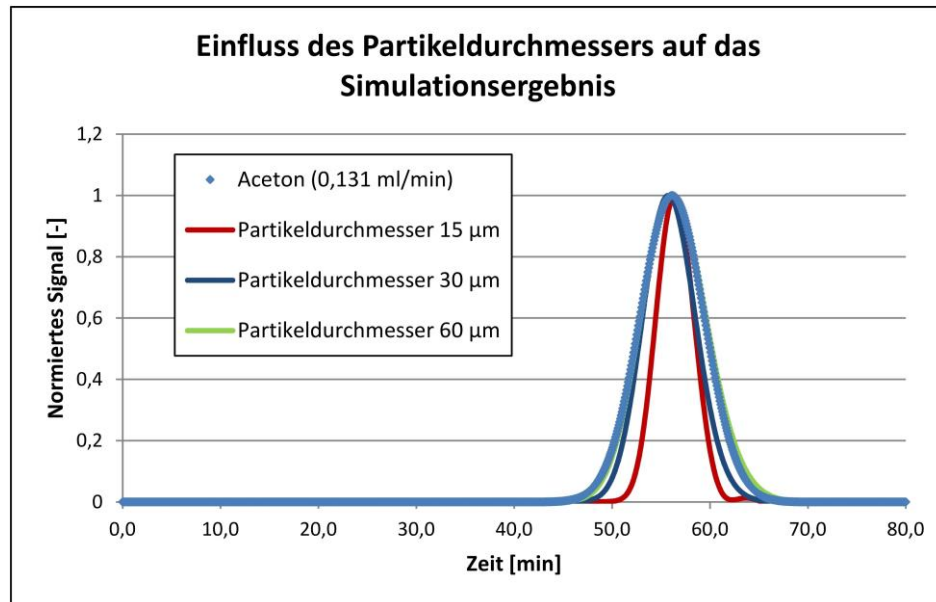


Abbildung 27: Einfluss des Partikeldurchmessers d_p auf das Simulationsergebnis am Beispiel von Aceton bei 0,131 ml/min auf der IEX Säule.

Grundsätzlich kann die Fluidodynamik sowie der Stofftransport aus der Kernströmung in die Poren und die damit verbundenen Korrelationen (siehe Kapitel 3.2) als valide angesehen werden. Die mittlere Verweilzeit wird für beide Adsorbenstypen im gesamten Molekülgrößen- und Flussratenbereich mit einer Genauigkeit von im Mittel 99,84 % vorhergesagt. Die maximale Abweichung beträgt hier 3,6 %. Das Bestimmtheitsmaß als Anhaltspunkt für die Richtigkeit der Peakform liegt im Mittel bei 0,94. Die größten Abweichungen finden sich dabei für sehr große Moleküle (> 600 kDa). Hier wurde experimentell ein größeres Tailing gemessen als das vom Modell simulierte. Es wird vermutet, dass es hier zu Wechselwirkungen mit den Kapillaren oder dem Säulenmaterial kommt, wie es auch bei den Messungen der Verweilzeit der Chromatographie-Anlage beobachtet wurde. Alle Ergebnisse sind in Tabelle 4 zusammengefasst:

Tabelle 4: Zusammenfassung der Validierungsversuche der Fluidodynamik von selbstgepackten Glassäulen mit partikulären Adsorbentien:

Adsorbens	Substanz	Flussrate	Molekülgröße	mittlere Verweilzeit			R ²
				gemessen	simuliert	Abweichung	
		[ml/min]	[g/mol]	[min]	[min]	[%]	[-]
IEX	IgG	1,00	144000	4,23	4,23	-0,06	0,988
		2,00		2,21	2,20	0,18	0,985
	Aceton	1,31	58	5,68	5,59	1,71	0,949
	Pullulan	1,31	1080	4,69	4,71	-0,42	0,991
	Dextran	1,31	150000	2,18	2,25	-2,80	0,968
	Pullulan	1,31	708000	2,33	2,32	0,56	0,877
	Aceton	0,13	58	56,14	55,85	0,52	0,973
	Pullulan	0,13	1080	47,10	47,57	-1,00	0,966
	Dextran	0,13	150000	26,71	25,74	3,63	0,888
	Pullulan	0,13	708000	23,73	24,19	-1,93	0,853
HIC	NaCl	0,13	58	55,35	55,36	-0,01	0,975
	Pullulan	0,13	1080	46,02	46,44	-0,89	0,892
	Dextran	0,13	150000	38,93	38,65	0,73	0,964
	Dextran	0,13	680000	33,85	34,67	-2,43	0,887
Mittelwerte						-0,16	0,940

Gleichgewicht

Wie bereits beschrieben wurde, kommen auf Grund der geringen zur Verfügung stehenden Mengen für die Isothermenmessungen des realen Stoffgemischs aus Fermentationsbrühe nur Schüttelversuche in Frage. Dabei sind die auftretenden Fehlerquellen recht groß. Ein Beispiel für eine Kurvenschar einer IgG Monomer Isotherme bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen ist in Abbildung 28 dargestellt. Zu erkennen ist, dass die Ergebnisse sowohl einem großen Fehler als auch einer gewissen Streuung unterliegen. Der Fehler ist dabei dem Fehlerfortpflanzungsgesetz folgend vor allem der Miniaturisierung des Versuchsaufbaus geschuldet. Größere Volumina, vornehmlich des Adsorbens, würden den Fehler deutlich minimieren. Dies würde allerdings auch die benötigte Feedmenge erhöhen. Des Weiteren spielen Zersetzungsprozesse eine Rolle. Um den Einsatz der iCCC als Capture Schritt zu überprüfen, wurde mit vergleichsweise unbehandelter Brühe gearbeitet. Das IgG wurde nicht stabilisiert. Eventuell vorhandene Proteasen wurden nicht entfernt. Daher kam es teilweise zu Zersetzungen und Ausfällungen, welche auch bei Doppelbestimmungen in einer Probe stärker als in der Vergleichsprobe ausfallen konnten. Damit lässt sich zum Beispiel der relativ große Fehlerbalken des letzten Messpunktes für

0,1 M Salz im Vergleich zum vorletzten Punkt derselben Reihe erklären. Die durchgezogenen Linien in Abbildung 28 stellen berechnete Verläufe für Langmuir-Isothermen da. Die dazugehörigen Parameter, maximale Beladung $q_{\max,i}$ und Henry-Koeffizient H_i , wurden entsprechend den Gleichungen (52) und (53) mit dem Salzgehalt korreliert. Die Werte sind in Tabelle 5 aufgeführt. Die Parameter d_1 und d_2 der HIC beschreiben die Salzabhängigkeit des linearen Terms, welche ebenfalls einem Potenzansatz (vgl. Gleichung (53)) folgt.

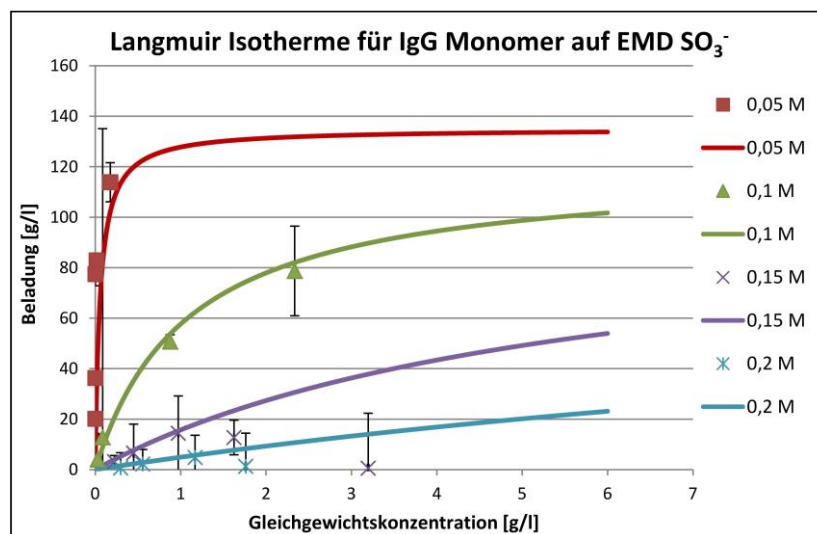


Abbildung 28: Isothermenschar für IgG Monomer auf Fractogel® EMD SO_3^- bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen.

Tabelle 5: Isothermenparameter aus Schüttelversuchen für Fractogel® EMD SO_3^- und EMD Phenyl:

Adsorbens	Parameter	Monomer	Dimer	HCP1	HCP2
IEX	a_1	4,20E-03	1,00E-06	6,00E-05	1,97E-04
	a_2	-4,42	-9,7	-5,56	-5,37
	b_1	-300	-5	-1300	-1500
	b_2	150	30	140	122
HIC	a_1	350,00	150,00	400,00	400,00
	a_2	2,60	2,50	5,00	1,60
	b_1	40,00	5,00	6,00	10,00
	b_2	3,00	3,00	2,50	3,00
	d_1	4,00	0,40	0,30	1,00
	d_2	2,00	1,00	1,00	1,50

Die Validierung der Simulationsergebnisse wurde für beide Adsorbentypen anhand des Vergleichs zwischen simulierten und gemessenen Chromatogrammen durchgeführt. Dabei wurden jeweils drei verschiedene Gradientensteigungen untersucht. Exemplarisch sind die Ergebnisse für das

Ionenaustauschmedium in Abbildung 29 dargestellt. Insgesamt wurden die mittleren Verweilzeiten mit einer Abweichung von im Mittel 3,3 % vorhergesagt. Die Genauigkeit ist dabei für den Ionenaustauscher höher als für die hydrophobe Interaktionschromatographie. Diese weist teilweise eine Abweichung von mehr als 8,8 % auf. Eine ähnliche Tendenz gilt auch für das Bestimmtheitsmaß. Dieses liegt im Mittel nur bei 0,875 und ist im Schnitt für die IEX größer als für die HIC. Alle Ergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

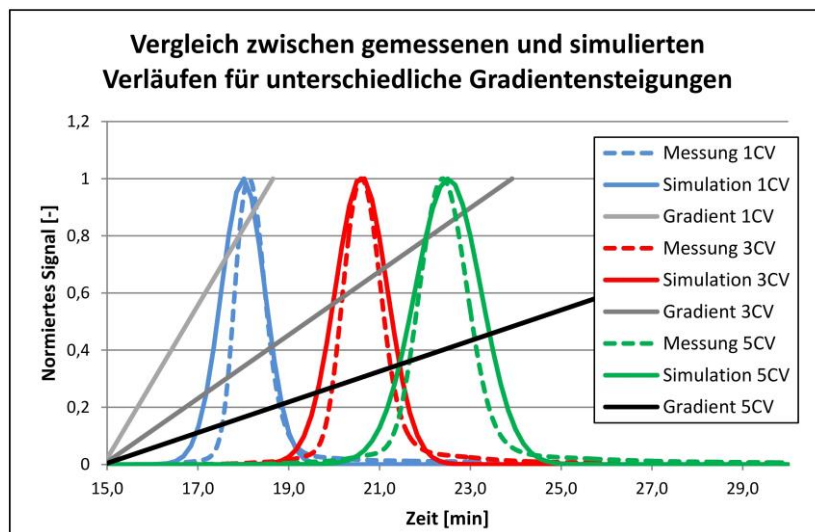


Abbildung 29: Gemessene (gestrichelte Linien) und simulierte (durchgezogene Linien) Chromatogramme von Fermentationsbrühe auf der Ionenaustausch Chromatographiesäule bei unterschiedlichen Gradientensteigungen.

Tabelle 6: Zusammenfassung des Vergleichs zwischen Messungen und Simulationsergebnissen für IgG Fermentationsbrühe auf Ionenaustausch- und Hydrophoben Interaktions Chromatographiesäulen bei unterschiedlichen Gradientensteigungen:

Adsorbens	Substanz	Flussrate	Gradient	Mittlere Verweilzeit			R ²
				gemessen	simuliert	Abweichung	
		[ml/min]	[CV]	[min]	[min]	[%]	[-]
IEX	Brühe	1	5	46,62	46,38	0,515	0,965
		2	1	18,44	17,99	2,463	0,831
		2	3	20,91	20,59	1,512	0,945
		2	5	22,61	22,50	0,504	0,937
HIC	Brühe	2	5	35,18	34,24	2,673	0,945
		2	10	54,98	58,51	-6,426	0,749
		2	16	69,59	76,36	-8,869	0,783
		2	20	85,90	88,85	-3,324	0,846
Mittelwerte						3,286	0,875

Die relativ ungenaue Vorhersage für die HIC scheint auf einen zu schmalen IgG Monomer Peak zurückzuführen zu sein. In Abbildung 30 sind die Simulationsverläufe für alle Komponenten den dazugehörigen Messpunkten aus einer Fraktionierung mit nachfolgender SEC Analyse gegenübergestellt. Zu erkennen ist, dass die Lage der Host Cell Proteine (HCP), welche zu zwei Schlüsselkomponenten zusammengefasst sind, stimmt. Zudem ist deren Konzentration zu gering um das Simulationsergebnis signifikant zu beeinflussen. Auch die Lage des Dimer Peaks scheint gut getroffen zu werden. Lediglich der Monomer Peak eluierte in der Simulation augenscheinlich etwas zu spät. Um diesen Peak zu verschieben, könnten die Isothermenparameter an die Simulationsergebnisse angepasst werden. Die relativ großen Fehlerbalken der Schüttelversuche erlauben einen gewissen Spielraum. Eventuell wäre auch eine andere Isothermenform besser geeignet als die angepasste Langmuir-Isotherme.

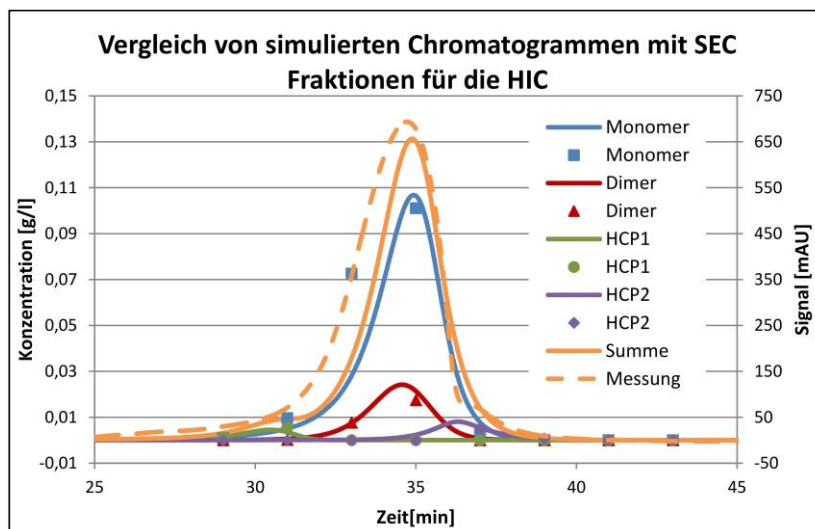


Abbildung 30: Vergleich zwischen Simulationsergebnissen (durchgezogene Linien) und SEC Fraktionen (Messpunkte) für die Hydrophobe Interaktions Chromatographie.

Grundsätzlich ist jedoch eine Abweichung der Verläufe von weniger als 5 % als hinreichend gute Übereinstimmung für den in dieser Arbeit angestrebten Prozessvergleich zu betrachten. Das vorliegende Modell ist universell einsetzbar und kann einfach durch die Änderung der Isothermenparameter von Ionenaustausch auf hydrophobe Interaktion umgestellt werden. Damit ist es für den Prozessvergleich der unterschiedlichen kontinuierlichen Chromatographieprozesse ebenso gut geeignet wie für Machbarkeitsstudien. Für eine genaue Prozessauslegung, bei der es auf eine hohe Genauigkeit der

Reinheitsbestimmung ankommt, müssten die Isothermenparameter jedoch noch genauer bestimmt werden.

3.4.3 Normalphasen Chromatographie

Die LiChroprep® SI 60 Säulen sind nur für den Prozessvergleich zwischen der bekannten Viersäulen SMB (4-SMB) und der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Einsäulen SMB (1-SMB) verwendet worden. Auf Grund der hohen Anzahl an Säulen wurde zur Minimierung der benötigten Rechenleistung das 1D Modell zur Simulation der 4-SMB verwendet. Um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, kommt dasselbe Modell auch für die 1-SMB zum Einsatz.

Es wurde auf ein für die SMB bekanntes Testgemisch aus Cyclopentanon und Cycloheptanon zurückgegriffen [Juza 1999]. Auf Grund ihrer Ähnlichkeit eluierten beide Stoffe bei den Frontalanalysen so kurz hintereinander, dass eine sichere Auswertung nicht möglich war. Die ermittelten Isothermen stammen daher ausschließlich aus den Pertubationsversuchen (vgl. Kapitel 3.2.5).

Für das zuerst eluierende Cycloheptanon wurde ein Henry-Koeffizient H_{C7} von 6,578 und ein Langmuir-Koeffizient K_{C7} von 0,0059 ermittelt. Für Cyclopentanon wurde $H_{C5} = 8,997$ und $K_{C5} = 0,0505$ gemessen. Die daraus resultierenden Isothermen sind in Abbildung 31 dargestellt.

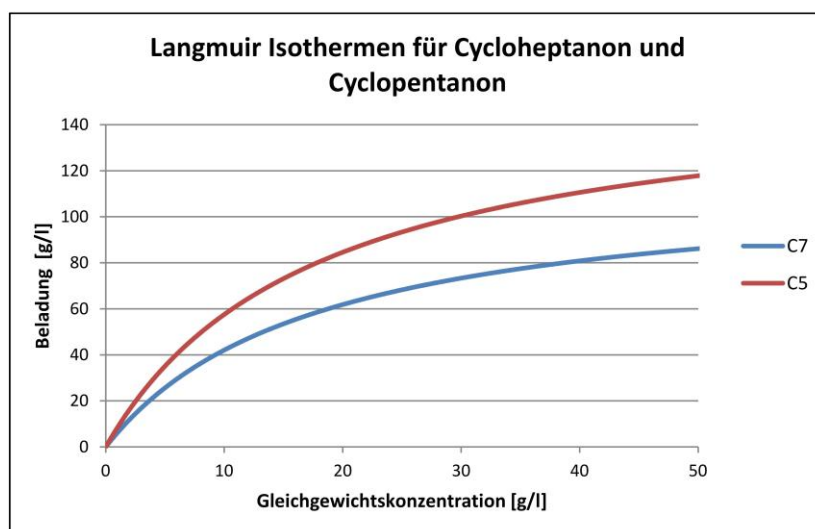


Abbildung 31: Langmuir-Isothermen für Cycloheptanon (C7) und Cyclopentanon (C5).

Da es sich bei den verwendeten Stoffen nicht um Proteine handelt und sie auch sonst in ihren Eigenschaften wenig mit Proteinen zu tun haben, wurde der axiale Dispersionskoeffizient nicht mit Formel (34) aus Stoff- bzw. Versuchsgrößen berechnet sondern mit den Gleichungen (36) und (37) aus Totzeitmessungen bestimmt ($D_{ax}=1\cdot 10^{-4}$). Daran angepasst wurde der Stoffdurchgangskoeffizient, welcher in diesem Fall $k_{eff}=1\cdot 10^{-2}$ betrug.

Auf Grund der isokratischen Fahrweise war keine Abhängigkeit des Henry-Koeffizienten H_i , der maximalen Beladung $q_{max,i}$ oder des Langmuir-Koeffizienten K_i von der Laufmittelkonzentration zu berücksichtigen. Diese konnten daher mit den bereits angegebenen Werten direkt implementiert werden. Die Ergebnisse aller Validierungsversuche sind in Tabelle 7 zusammengefasst. Die mittlere Abweichung der Verweilzeiten liegt bei weniger als 0,9 %, das Bestimmtheitsmaß im Mittel bei 0,92. Die maximale Abweichung der mittleren Verweilzeit betrug nie mehr als 2%. Das Modell ist daher für diesen Anwendungsfall als valide zu betrachten.

Größere Abweichungen im Bestimmtheitsmaß sind auf starkes Tailing zurückzuführen (vgl. Abbildung 32). Dies ist auf einen zu geringen Rückdruck während des Packens zurückzuführen. Der Druck war auf Grund nachgeschalteter Detektoren und Fraktionssammler bei den Peakmessungen größer als beim Packen und sorgte für eine Komprimierung der Packung. Dabei entstand ein Reservoir zwischen Stempel und Festbett, welches ohne Volumenstrom wieder verschwand. Dies war auch durch die verwendeten Stempel nicht zu kompensieren. Letztere sind ebenfalls etwas zu weich für die verwendeten Drücke von bis zu 80 bar, so dass auch diese teilweise nachrutschten. Die Verwendung von Stahlsäulen wäre hier besser. Diesem Phänomen in den Simulationen allein mit einer Erhöhung des axialen Dispersionskoeffizienten zu begegnen wäre nicht sinnvoll, da auch die Peakfront nach vorne ausweichen würde. Es müsste ggf. ein zusätzliches Totvolumen in Form eines Rührkessels implementiert werden. Für den in dieser Arbeit angestrebten Prozessvergleich ist die Abweichung jedoch unproblematisch.

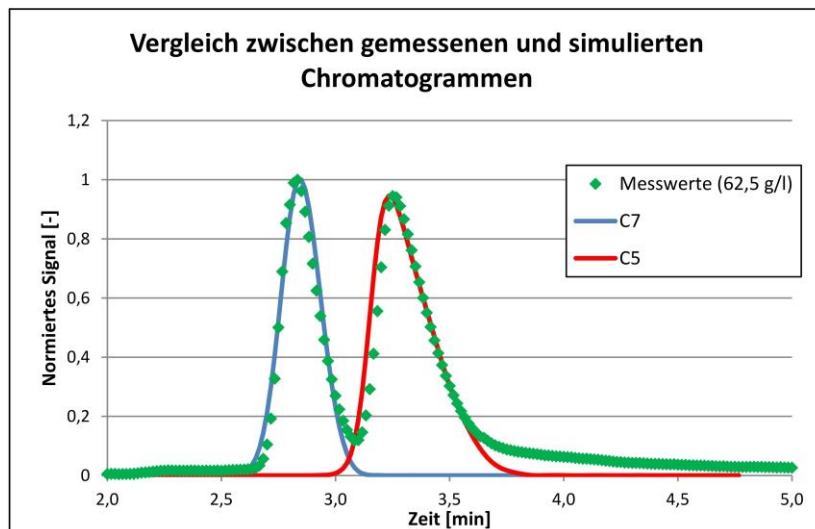


Abbildung 32: Vergleich zwischen gemessenen (gepunktet Linien) und simulierten (durchgezogene Linien) Verläufen für Cyclopentanon (rot) und Cycloheptanon (blau) auf einer Normalphasen Chromatographiesäule

Tabelle 7: Zusammenfassung der Validierungsversuche für die Normalphasen Chromatographiesäule:

Adsorbens	Substanz	Flussrate	Konzentration	Mittlere Verweilzeit			R²
				gemessen	simuliert	Abweichung	
		[ml/min]	[g/l]	[min]	[min]	[%]	[-]
SI 60	Toluol	5	-	3,51	3,47	1,32	0,917
	C7	12,50	0,5	2,91	2,92	-0,25	0,950
			1,0	2,90	2,92	-1,02	0,907
			2,0	2,91	2,92	-0,44	0,976
			3,9	2,90	2,92	-0,62	0,939
			7,8	2,89	2,92	-1,06	0,946
			15,6	2,88	2,91	-1,06	0,910
			31,3	2,88	2,89	-0,35	0,945
			62,5	2,86	2,85	0,17	0,985
	C5	12,50	0,5	3,47	3,46	0,41	0,945
			1,0	3,48	3,49	-0,32	0,848
			2,0	3,43	3,48	-1,41	0,910
			3,9	3,41	3,48	-1,95	0,810
			7,8	3,41	3,46	-1,59	0,865
			15,6	3,39	3,44	-1,61	0,852
			31,3	3,37	3,39	-0,86	0,950
			62,5	3,33	3,32	0,55	0,971
Mittelwerte:					0,855	0,919	

3.4.4 Membranchromatographie

3.4.4.1 *Fluidodynamik*

Die in Kapitel 3.2 in Bezug auf die Fluidodynamik beschriebenen Korrelationen sind für Membranadsorber größtenteils nicht gültig. Auch die Bestimmung des axialen Dispersionskoeffizienten über Totzeitmessungen ist nur bedingt sinnvoll. Die Auswertung der Gleichungen (36) bzw. (37) liefern einen axialen Dispersionskoeffizienten für das gesamte Modul. Dieses setzt sich allerdings, wie in Kapitel 3.1.3 bereits beschrieben wurde, aus fünf Teilen zusammen:

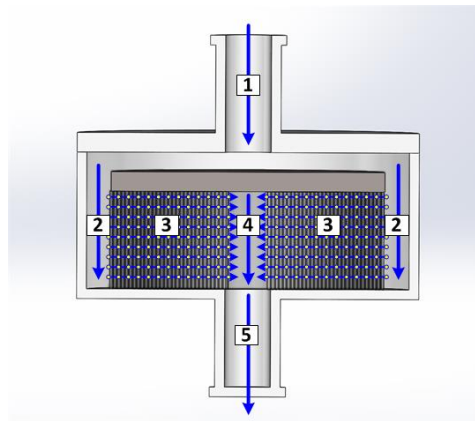


Abbildung 33: Fluiddynamische Verteilung in einem Membranchromatographiemodul.

Jeder Bereich hat dabei einen eigenen axialen Dispersionskoeffizienten. Die gesamte Dispersion zusammengekommen ergäbe den über Tracerexperimente bestimmten Wert. Daher wurde die gemessene Dispersion als Anhaltspunkt genommen und die fünf einzelnen Dispersionskoeffizienten über Simulationsstudien iterativ ermittelt. Als beste Aufteilung ergab sich ein axialer Dispersionskoeffizient D_{ax} von $9 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{s}$ für den Einlauf vor der Membran (Bereich 1 und 2 in Abbildung 33), $5 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^2/\text{s}$ für die Membran selbst (Bereich 3) sowie $250 \text{ cm}^2/\text{s}$ für den Auslauf hinter der Membran (Bereich 4 und 5). Die Werte für Zonen 1 bis 3 liegen in einem für vergleichbare Strömungsverhältnisse bekannten Größenordnungsbereich. Der Auslauf weist vergleichsweise hohe Dispersionskoeffizienten auf. Die Umrechnung des axialen Dispersionskoeffizienten in die Bodenstein-Zahl Bo über Gleichung (60) ermöglicht einen einfacheren Vergleich der Strömungsverhältnisse [Levenspiel 1999]:

$$Bo = \frac{v \cdot l}{D_{ax}} \quad (60)$$

Hierbei ist v die Strömungsgeschwindigkeit und l die charakteristische Länge.

Bei großen Bodenstein-Zahlen dominiert die Konvektion, die Strömung gleicht der eines idealen Strömungsrohrs. Bei kleineren Werten überwiegt die Dispersion, das System verhält sich wie ein idealer Rührkessel. Der kritische Wert für den Übergang vom Strömungsrohr zum Rührkessel liegt bei einer Bodensteinzahl von 5 [Levenspiel 1999]. Für den Einlauf ergeben sich Bodenstein-Zahlen zwischen 30 und 120. Dieser Bereich verhält sich daher wie ein ideales Strömungsrohr. Der Auslauf erreicht Bodenstein-Zahlen von $6,6 \times 10^{-5}$ für Zone 4 und $1,1 \times 10^{-4}$ für Zone 5. Die damit verbundene Ähnlichkeit zu einem idealen Rührkessel ist über die vorhandene Strömungsführung erklärbar (vgl. Abbildung 33). Der axiale Abfluss in Zone 4 wird permanent mit radialen Strömen aus der Membran durchmischt. Dieser Kreuzstrom sollte intensive Durchmischung begünstigen.

Mit den ermittelten Werten sind gute Simulationsergebnisse möglich. Abbildung 34 zeigt beispielhaft den Vergleich zwischen gemessenen (blaue Punkte) und simulierten Kurvenverläufen (rote Linie) eines Tracerexperiments bei einem Volumenstrom von 0,5 ml/min. Beide Verläufe stimmen gut überein. Zu erkennen ist, dass der gemessene Peak eine höhere Asymmetrie aufweist als es die Simulationen widerspiegeln. Die Kurvenfront steigt relativ steil an. Der Peak fällt dann jedoch nur langsam ab.

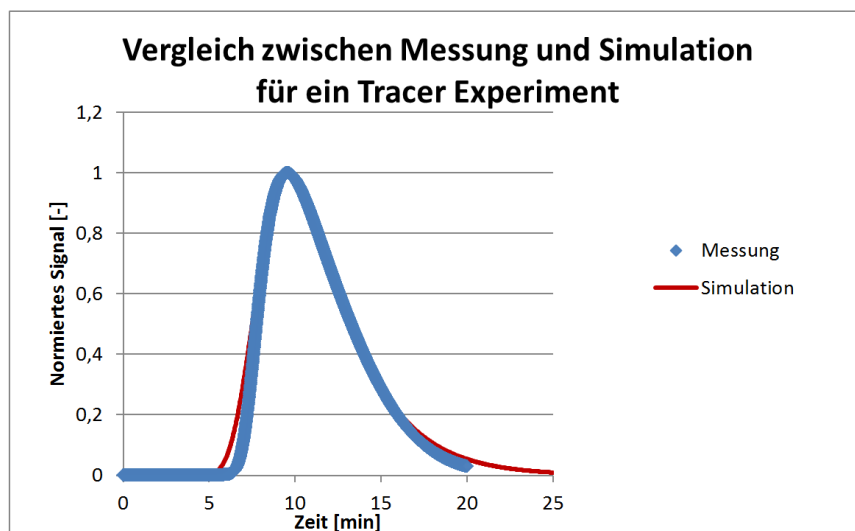


Abbildung 34: Vergleich zwischen gemessenen (blaue Punkte) und simulierten (rote Linie) Verweilzeitverläufen für Membranadsorbermodule.

Über alle Versuche betrachtet liegt die Abweichung der mittleren Verweilzeit bei 0,82 %, das Bestimmtheitsmaß bei 0,984. Die Fluidodynamik ist damit als valide zu betrachten.

3.4.4.2 Stofftransport und Isothermen

Der Wert für den Stoffdurchgang und die Übertragungsfläche ist in diesem Modell in dem Parameter kla zusammengefasst. Parameterstudien haben ergeben, dass dieser Wert in einer Größenordnung zwischen $200 \frac{cm}{s} < kla < 2000 \frac{cm}{s}$ unsensitiv ist und kaum einen Einfluss auf das Ergebnis hat. Es wurde daher mit $kla = 1000 \frac{cm}{s}$ gerechnet.

Die Isothermen für die IEX und HIC Membrane wurden, wie in Kapitel 3.3.4.2 beschrieben wurde, bestimmt. Für die Zielkomponente IgG sind die Verläufe in Abbildung 35 dargestellt. Die Nebenkomponten wurden zu Schlüsselkomponenten zusammengefasst. HCP 1 ist jeweils die schwächer Bindende, HCP 2 die stärker bindende Komponente. Für die hydrophobe Interaktions-Membran ist die Langmuir-Isotherme um einen linearen Term mit dem Faktor L_1 erweitert worden. Alle Parameter sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

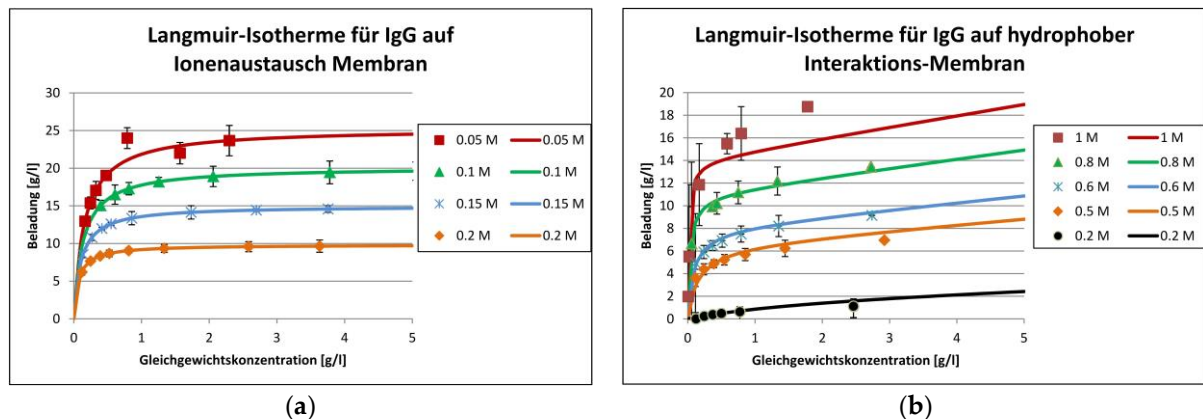


Abbildung 35: Langmuir-Isotherme bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen für IgG auf einer Ionenaustausch Membran (a) und einer hydrophoben Interaktions-Membran (b).

Tabelle 8: Isothermenparameter für IgG aus Protein A Analysen für Schüttelversuche von Sartobind® S und Sartobind® Phenyl:

Parameter	Ionenaustauschmembran			Hydrophobe Interaktions-Membran		
	Komponente			Komponente		
	IgG	HCP 1	HCP 2	IgG	HCP 1	HCP 2
a₁	119	2,98	42,7	742	186	200
a₂	-0,1	-1,78	-0,33	4,1	1,98	3
b₁	-103	-18	-0,535	15	14	200
b₂	30	8,73	1,48	-1	3,93	200
L₁	0	0	0	1	0	0

Lässt man die für reale Stoffgemische häufig vorkommenden Probleme, wie Produktdegeneration, außen vor, so ist die Bestimmung der Isothermen für Membranadsorber weniger fehleranfällig als für partikuläre Chromatographiemedien. Dies liegt vor allem daran, dass die Genauigkeit der Stanzlingherstellung größer ist als die Bestimmung des Adsorbervolumens und dass die Stanzlinge einfacher von der Feedbrühe zu trennen sind.

Tabelle 9 fasst die Ergebnisse der Modellvalidierung zusammen. Es besteht eine gute Übereinstimmung zwischen Simulationen und Experimenten. Die Abweichung der mittleren Verweilzeit für den dominierenden IgG Peak liegt zwischen 0 % und 7 %. Die mittlere Abweichung beträgt 2,47 %. Das Bestimmtheitsmaß ist nicht so gut wie für die fluiddynamischen Versuche. Es variiert zwischen 0,65 und 0,95 mit 0,81 als Mittelwert.

Tabelle 9: Zusammenfassung der Validierungsversuche für Membranchromatographie Module:

Modul	Volumen- strom	Gradienten- steigung	Mittlere Verweilzeit (IgG)			Bestimmtheitsmaß
			Experiment	Simulation	Abweichung	
			[min]	[min]	[%]	
	[ml/min]	[CV]				R² (-)
Ionen Austausch	0,5	1	38,73	38,09	1,66	0,864
		3	47,20	47,18	0,04	0,777
		5	53,60	52,28	2,46	0,770
Hydrophobe Interaktion	0,5	1	40,26	39,42	2,09	0,945
		3	46,54	47,18	-1,38	0,848
		5	53,51	57,36	-7,19	0,647
			Mittelwert	2.47		0.809

Abbildung 36 zeigt den Vergleich zwischen den Simulationsergebnissen und der Messung für das Beispiel mit der größten Abweichung. Dies ist der 5 CV Gradient auf der hydrophoben Interaktions-Membran. Das Bestimmtheitsmaß beträgt hier 0,647.

Es ist zu erkennen, dass der Start und Endpunkt der Peaks gut getroffen wird. Auch die Lage der Peak-Maxima in den Simulationen stimmt mit dem Experiment überein. Zu erkennen ist der IgG Peak und der wesentlich kleinere Peak der stärker bindenden HCP Komponenten.

Die Peakform ist jedoch bei den Simulationen wesentlich gaußförmiger. Im Experiment ist eine sehr scharfe Peakfront und sehr ausgeprägtes Tailing zu erkennen. Die Abweichung könnte auf nicht ausreichend akkurate Isothermenparameter, die simplifizierte k/a Annahme oder abweichende Fluidodynamik zurückzuführen sein. Dieses Beispiel ist, wie bereits erwähnt, das Beispiel mit der schlechtesten Übereinstimmung. Insgesamt sind die erhaltenen Ergebnisse für Konzeptstudien einer möglichen kontinuierlichen Prozessführung ausreichend genau und das Modell für diesen Zweck einsetzbar [Strube 2011, Strube 2014].

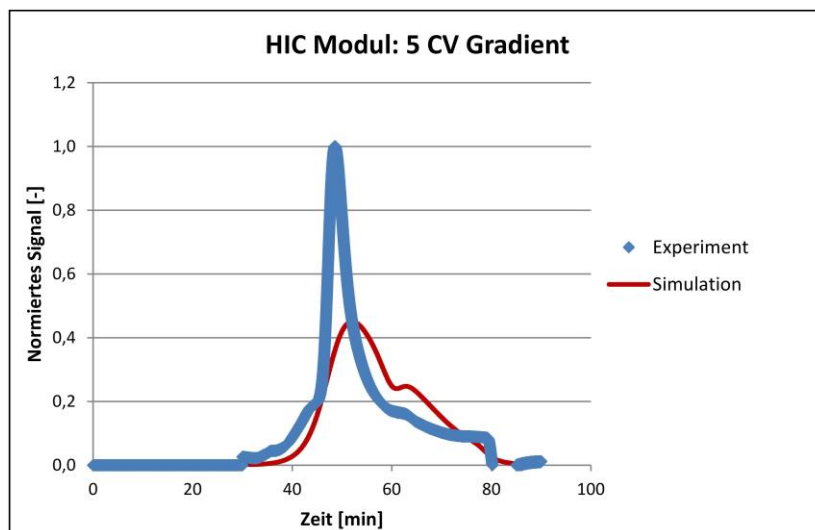


Abbildung 36: Vergleich zwischen experimentellen (blaue Punkte) und simulierten (rote Linie) Chromatographie Verläufen des hydrophoben Interaktions-Moduls bei einem Gradienten von 5 CV.

4. Prozessbetrachtung

4.1 Machbarkeitsstudien: 1-SMB als Alternative zur Mehrsäulen SMB

Die Machbarkeitsstudien werden mit dem in Kapitel 3 vorgestellten und validierten Modell der LiChroprep® Säulen durchgeführt. Es gelten auch die dort benutzten Modellparameter. Für die Simulation der Viersäulen SMB wurden vier Säulen verschaltet und mit den dazugehörigen Zuflüssen: Kreislauf, Eluent und Feed, sowie Abflüssen: Extrakt und Raffinat, versehen. Diese werden zeitgesteuert nach Ablauf der Taktzeit je eine Säule weiter geschaltet.

Für die Simulation der 1-SMB wurde nur eine Säule verwendet. Diese wird mit einem Ventil vor und nach der Säule versehen, welches ebenfalls zeitgesteuert die Zu- und Abläufe in die dazugehörigen vier Zonen leitet. Diese sind entweder mit Verweilzeitstrecken (Gleichung (29)) oder Tanks (Gleichung (61)) versehen. In diesem Fall ist, entgegen der Annahme für Gleichung (28), die Volumenänderung nicht zu vernachlässigen:

$$\frac{\partial c_i}{\partial t} \cdot V + \frac{\partial V}{\partial t} \cdot c_i = c_{in,i} \cdot \dot{V}_{in} - c_{out,i} \cdot \dot{V}_{out} \quad (61)$$

Die Auslegung der SMB erfolgt wie in Kapitel 2.1.3.1 beschrieben wurde. Zur Erstellung des Dreiecksdiagramms werden die ebenfalls im Kapitel Modellierung bestimmten Isothermen verwendet. Diese sind zur besseren Übersicht hier erneut aufgeführt:

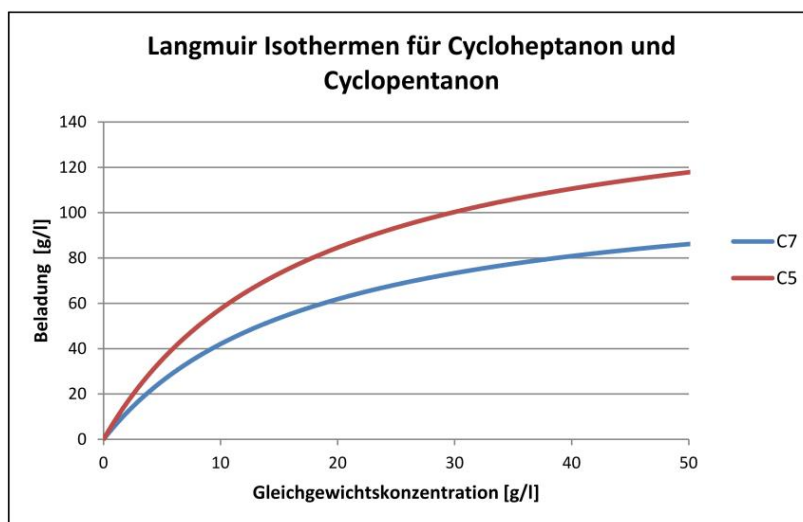


Abbildung 37: Langmuir-Isothermen für Cycloheptanon (C7) und Cyclopentanon (C5) auf LiChroprep® SI 60.

Die Gleichungen zur Berechnung des Arbeitsdiagramms sind in Tabelle 1 aufgeführt. Mit den Parametern $H_{C7}=6,578$ und $K_{C7}=0,0059$ für Cycloheptanon und $H_{C5}=8,997$ und $K_{C5}=0,0505$ für Cyclopentanon sowie einer angenommenen Feed Konzentration von 5 g/l ergibt sich das in Abbildung 38 dargestellte Dreiecksdiagramm. Für die Simulationsstudien wurden zwei Arbeitspunkte innerhalb der Dreiecke gewählt. Arbeitspunkt 1 wurde so gewählt, dass er nahe am idealen Punkt liegt. Dies entspräche genau den linken, oberen Ecken der beiden Dreiecke. Diese Punkte sind jedoch in der Regel instabil, so dass ein Sicherheitszuschlag berücksichtigt wird. In diesem Fall ist das ca. ein Abstand von $m=0,5$. Die Volumenströme wurden weiterhin so angepasst, dass möglichst ganzzahlige Werte entstehen, um einen späteren experimentellen Vergleich nicht durch krumme Volumenströme unnötig zu erschweren. Die Betriebsparameter sind in Tabelle 10 aufgeführt.

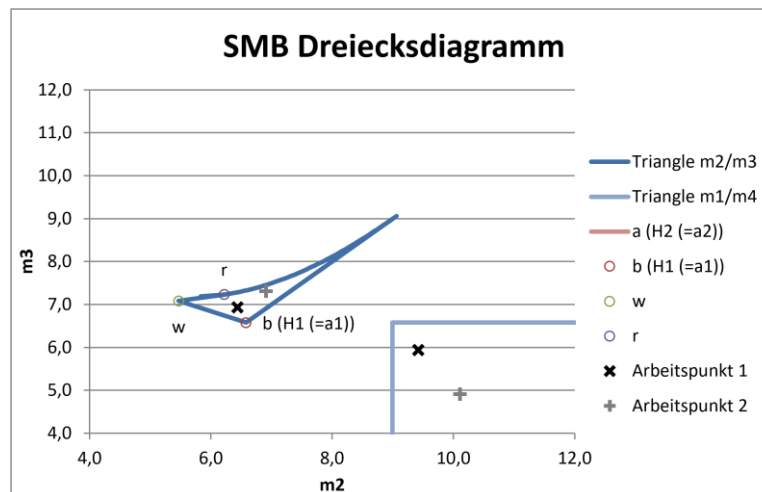


Abbildung 38: Dreiecksdiagramm für die Bestimmung der Arbeitspunkte.

Tabelle 10: Betriebsparameter für die SMB Läufe:

		Arbeitspunkt 1	Arbeitspunkt 2
Taktzeit	[s]	87	70
Volumenströme:			
Zone 1	[ml/min]	30,8	40
Extrakt	[ml/min]	6	8
Feed	[ml/min]	1	1
Raffinat	[ml/min]	2	6
Eluent	[ml/min]	7	13
Flussverhältnis			
m_1	[-]	9,5	10,1
m_2	[-]	6,5	6,9
m_3	[-]	7	7,3
m_4	[-]	6	4,9

Die für den Arbeitspunkt 1 resultierenden Konzentrationsverläufe innerhalb der Säulen zum Taktende sind in Abbildung 39 (a) dargestellt. Arbeitspunkt 2 wurde daraufhin so optimiert, dass der recht starke Durchbruch des Cycloheptanons durch Zone 4 auf Zone 1 minimiert wird (Abbildung 39 (b)).

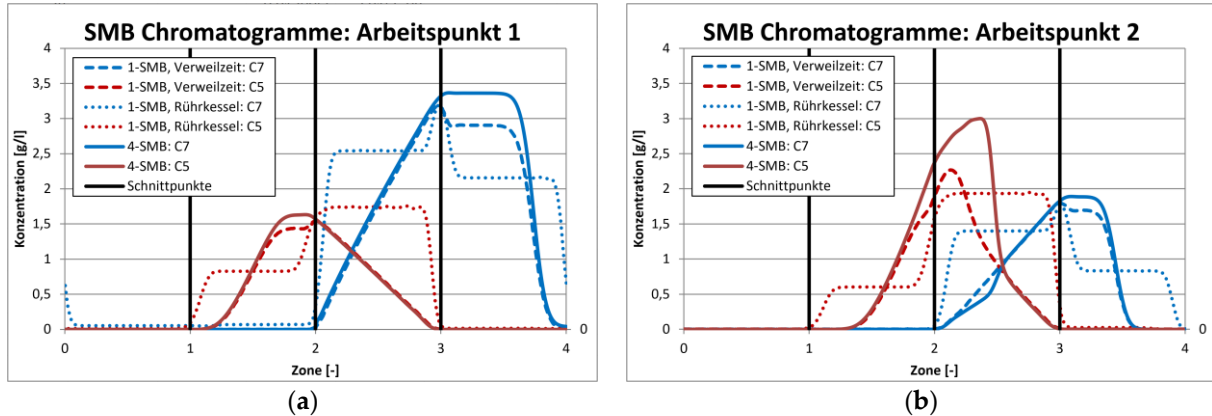


Abbildung 39: SMB Chromatogramme für den Arbeitspunkt 1 (a) und Arbeitspunkt 2 (b). Dargestellt ist das Taktende. Das Cyclopentanon ist die rote, das Cycloheptanon die blaue Komponente. Die durchgezogenen Linien gehören zur 4-Säulen SMB. Die 1-SMB mit Verweilzeitstrecken ist gestrichelt, mit Tanks gepunktet dargestellt.

In Abbildung 39 ist zu erkennen, dass die Verläufe der 4-SMB und der 1-SMB mit Verweilzeitstrecken gut übereinstimmen. Dies gilt für beide Arbeitspunkte. Auch die Leistungskennzahlen wie Ausbeute, Reinheit, Produktivität und Eluentenverbrauch sind nahezu identisch. Es wird jeweils 100 % Ausbeute und Reinheit erreicht bei 89 g/l/d Produktivität. Der erste Betriebspunkt ist mit einem Eluentenverbrauch von 1,4 l/g im Vergleich zum zweiten Betriebspunkt mit 2,6 l/g ökonomischer. Zum Vergleich: eine Trennung mittels Batch-Chromatographie würde bei 100 % Reinheit beider Komponenten und 98 %iger Ausbeute eine Produktivität von 5,96 g/l/d und einen Eluentenverbrauch von 150 l/g aufweisen. Diese Trennung ist auf Ausbeute optimiert, nicht auf Produktivität.

Unterschiede in den Konzentrationsverläufen der 1-SMB mit Verweilzeitstrecke und der 4-SMB treten an den Kolonnenenden auf, wo die Produktkonzentration hoch ist. Dies ist das Zonenende von Zone 2 für Cyclopentanon und der Zonenanfang von Zone 4 für Cycloheptanon. Die geringere Konzentration in der 1-SMB ist darauf zurückzuführen, dass die Enden der Verweilzeitstrecken in der Simulation nicht geschlossen sind. Es diffundiert Produkt aus der Verweilzeitstrecke in die zu dem Produkt gehörenden Tanks. Dies beeinflusst weder die Ausbeute noch die Reinheit,

ändert aber die Konzentration, mit der die Säule im nächsten Zyklus aus der Verweilzeitstrecke beladen wird.

Für die Simulationen mit Rührkesseln als Zwischenspeicher zeigt sich ein deutlich negativer Einfluss. Dies ist auf die Vernichtung des Konzentrationsprofils zurückzuführen. Für den Arbeitspunkt 1 ist damit keine 100 %ige Trennung möglich. Der daraus resultierende Ausbeuteverlust spiegelt sich auch in schlechteren Produktivitäten und spezifischen Eluentenverbräuchen wider. Für Arbeitspunkt 2 sind die Werte wieder auf vergleichbarem Niveau.

Alle Ergebnisse sind in Tabelle 11 zusammengefasst:

Tabelle 11: Übersicht über die Leistungskennzahlen der 4-SMB und der 1-SMB Varianten für beide Arbeitspunkte:

		4-SMB		1-SMB: Verweilzeit		1-SMB: Tanks	
		C7	C5	C7	C5	C7	C5
Arbeitspunkt 1							
Reinheit	[-]	1,00	1,00	1,00	1,00	0,99	0,92
Ausbeute	[-]	1,00	1,00	1,00	1,00	0,76	0,98
Produktivität	[g/l/d]	89,36	89,52	89,17	89,52	68,28	87,82
Eluentenverbrauch	[l/g]	1,40	1,40	1,41	1,40	1,84	1,43
Arbeitspunkt 2							
Reinheit	[-]	1,00	1,00	1,00	1,00	0,97	0,99
Ausbeute	[-]	1,00	1,00	1,00	1,00	0,99	0,96
Produktivität	[g/l/d]	89,51	89,44	89,50	89,47	88,75	85,67
Eluentenverbrauch	[l/g]	2,60	2,60	2,60	2,60	2,62	2,72

Die Simulationen zeigen, dass das Konzept der 1-SMB funktioniert. Bei der Verwendung von Verweilzeitstrecken ergeben sich nahezu identische Prozesskennzahlen. Der apparativ einfachere Aufbau mit Rührkesseln in den einzelnen Zonen ist ebenso möglich, jedoch muss ein Betriebspunkt gewählt werden, der weiter vom idealen Punkt entfernt liegt.

Auf eine experimentelle Studie der 1-SMB wurde auf Grund der nicht vorhandenen Gradiententauglichkeit und der damit einhergehenden, niedrigeren Bedeutung für biopharmazeutische Trennungen zugunsten der iCCC verzichtet.

4.2 integrated Counter Current Chromatography

4.2.1 Simulationsstudien

Die iCCC Verschaltung wird zunächst simuliert. Dazu werden die in Kapitel 3 validierten Modelle einer Ionenaustausch- und Hydrophobe Interaktionschromatographie-Säule in einer Simulation verschaltet. Die benötigten Tanks sind, ähnlich wie bei der 1-SMB, mit Gleichung (61) implementiert.

Die Säulen haben jeweils einen Durchmesser von 1 cm und eine Festbettlänge von 10 cm. Die Fermentationsbrühe wird mit einer Zusammensetzung von 5,8 g/l IgG Monomer, 1,2 g/l IgG Dimer, 0,2 g/l HCP1 und 0,4 g/l HCP2 injiziert. HCP1 und HCP2 fassen als Schlüsselkomponenten alle Host Cell Proteine zusammen. HCP1 ist jeweils die schwachbindende, HCP2 die starkbindende Komponente. Das Injektionsvolumen auf die IEX-Säule beträgt 0,5 ml pro Zyklus.

Es wird auf beiden Säulen das gleiche Elutionsprofil gefahren. Bei einem Volumenstrom von 2 ml/min erfolgt nach der Injektion zunächst ein 3 CV Wasch-Schritt, gefolgt von einem 10 CV Gradienten. Anschließend folgen je 3 CV Regeneration und Re-Equilibration. Der Gradient bei der Ionenaustausch Säule startet bei einer Salzkonzentration von 0,02 mol/l und endet bei 0,35 mol/l. Die Regeneration erfolgt bei 1 mol/l Salzgehalt. Die Hydrophobe Interaktionschromatographie beginnt bei 1 mol/l. Vor dem linearen Gradienten erfolgt ein Sprung auf 0,65 mol/l. Der Gradient endet bei 0,02 mol/l.

Die zur Wiederbeladung verwendeten Fraktionen werden in Tanks zwischengespeichert. Die Salzkonzentration in den Tanks bleibt zunächst unverändert. Alle anderen Simulationsparameter entsprechen denen der Validierung.

Die Ergebnisse des ersten Simulationslaufs sind in Abbildung 40 abgebildet. Die durchgezogenen Linien zeigen die Chromatogramme vom letzten Zyklus. In gestrichelt sind die vorhergehenden Läufe dargestellt. Die einzelnen Komponenten sind farbig unterscheidbar. Blau ist das IgG Monomer, rot das Dimer, grün bzw. violett HCP1 bzw. HCP2. Die schwarzen, vertikalen Linien sind die Schnittpunkte der Fraktionen. Die durchgezogene graue Linie entspricht dem Salzgehalt am Kolonnenausgang. An dessen Verlauf für die HIC (Abbildung 40 (b)) ist zu erkennen, dass die erste Fraktion der HIC zu

wenig Salz enthält. Besagte Fraktion wird zwischen Minute 97 und 113 gezogen und einen Zyklus später auch wieder auf die HIC Säule geladen. Der Einbruch der Salzkonzentration ab Minute 70 resultiert aus dieser Fraktion. Auf Grund der zu niedrigen Salzkonzentration eluiert dabei gleichzeitig auch Produkt.

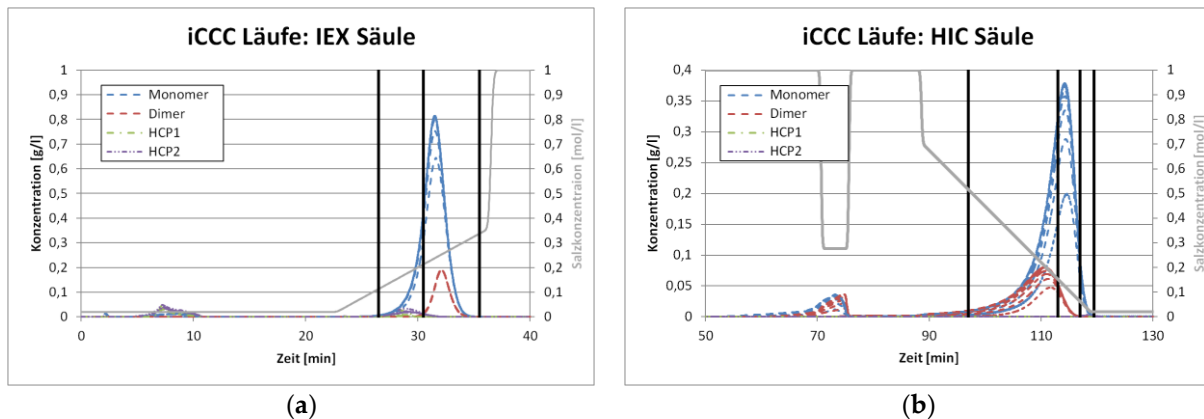


Abbildung 40: iCCC Simulationen, Lauf 1: (a) IEX Säule; (b) HIC Säule

In Abbildung 40 ist weiterhin zu erkennen, dass es zu einer Steigerung der Produktkonzentration kommt. Diese liegt für die HIC (Abbildung 40 (b)) ca. bei Faktor 2. Die Aufkonzentrierung auf der IEX Säule (Abbildung 40 (a)) ist geringer. Dies liegt daran, dass die hierfür notwendigen Fraktionen kaum Produkt enthalten. Die Fraktionen zur Wiederbeladung auf der IEX sind die erste Fraktion der IEX selbst und die letzte der HIC.

Die mittlere Fraktion der HIC ist die Produktfraktion. Diese enthält keine HCP mehr. Im Vergleich zum Feed ist weiterhin das IgG Dimer deutlich abgereinigt. Dies lag ursprünglich bei 17 %, hat in der Produktfraktion lediglich noch ca. 6 % Anteil am IgG insgesamt. Die Reinheit liegt vom ersten Zyklus an bei >99,9 %. Die Ausbeute steigt über die Zyklen an. Die geringe Ausbeute der ersten Zyklen ist nicht auf Produktverlust zurückzuführen. Das Produkt bleibt im System und sorgt für die höheren Konzentrationen. Die Ergebnisse für Ausbeute, Reinheit (a) und Monomer Konzentration (b) der einzelnen Zyklen sind in Abbildung 41 abgebildet.

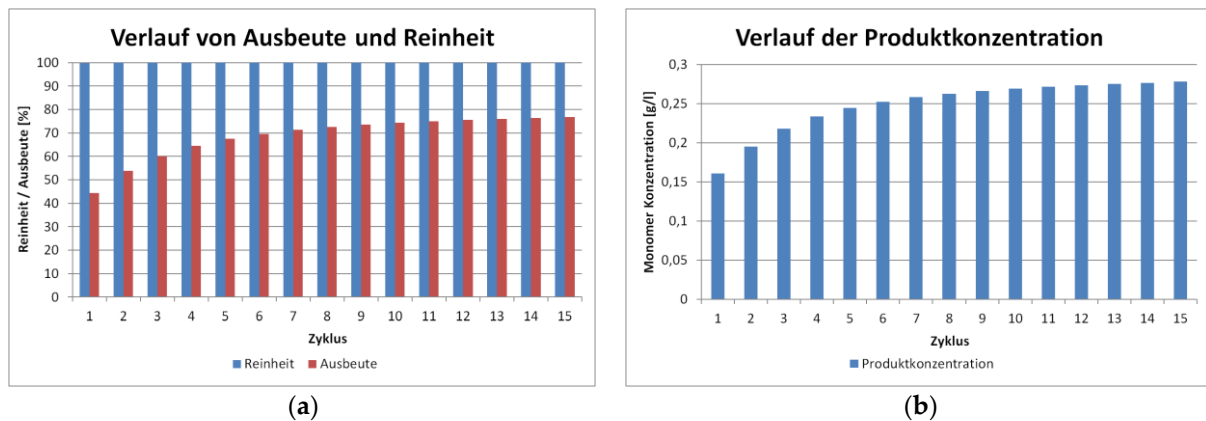


Abbildung 41: iCCC Simulationen, Lauf 1: Verlauf von Ausbeute und Reinheit (a) sowie Monomer Konzentration (b) über die Anzahl der Zyklen.

Es ist dabei zu erkennen, dass ab dem zehnten Zyklus der stationäre Zustand erreicht wird. Hier beträgt die Reinheit >99,9 %, die Ausbeute liegt bei 76,7 %. Wird eine Ionenaustausch- gefolgt von einer Hydrophoben Interaktionschromatographie im Batch Modus betrieben, lassen sich bei gleichen Parametern 99,4 % Reinheit bei 80,9 % Ausbeute erzielen. Dabei wird jedoch keine Abreicherung des IgG Dimer erreicht. Die geringe Ausbeute der iCCC Verschaltung liegt in diesem Fall, wie bereits erwähnt wurde, an dem Produktdurchbruch auf Grund des zu geringen Salzgehalts auf der HIC-Säule. Aus diesem Grund wird in einem zweiten Durchlauf die Salzkonzentration in den Fraktionstanks angepasst. Auf Grundlage des Volumens der Fraktionen im Tank erfolgt eine Zugabe von Bindungspuffer. In Lauf 2 wurden 25 vol.-%, in Lauf 3 50 vol.-% Puffer hinzugefügt. Dies sorgt für eine bessere Produktbindung, verlängert jedoch insgesamt die Prozesslaufzeit auf Grund längerer Beladungszeiten. Die Chromatogramme für Lauf 3 sind in Abbildung 42 dargestellt.

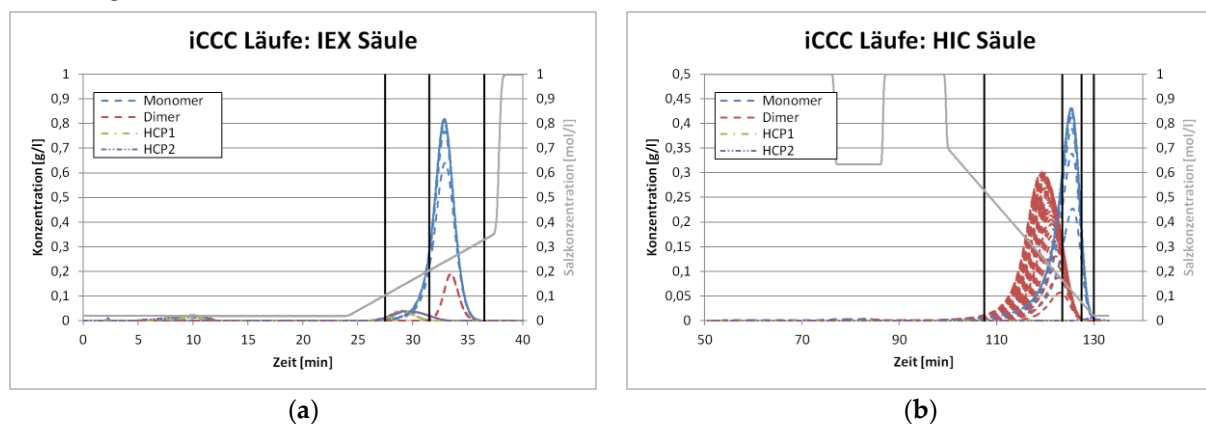


Abbildung 42: iCCC Simulationen, Lauf 3: (a) IEX Säule; (b) HIC Säule

Wie zu sehen ist, fällt der Einbruch der Salzkonzentration auf der HIC deutlich geringer aus. Eine Elution des Produktes an dieser Stelle bleibt aus. Bei ebenfalls >99,9% Reinheit steigt die Ausbeute an. Nach Zyklus 10 liegt sie bei >90 %, ab Zyklus 23 bei >95 %. Der stationäre Zustand wird ab Zyklus 35 mit einer Ausbeute von 96,6 % erreicht. Auf Grund der stärkeren Aufkonzentrierung des Dimers in der HIC hat dieses im Produkt nun 13 % Massenanteil. Die Werte für die einzelnen Zyklen sind in Abbildung 43 zusammengefasst.

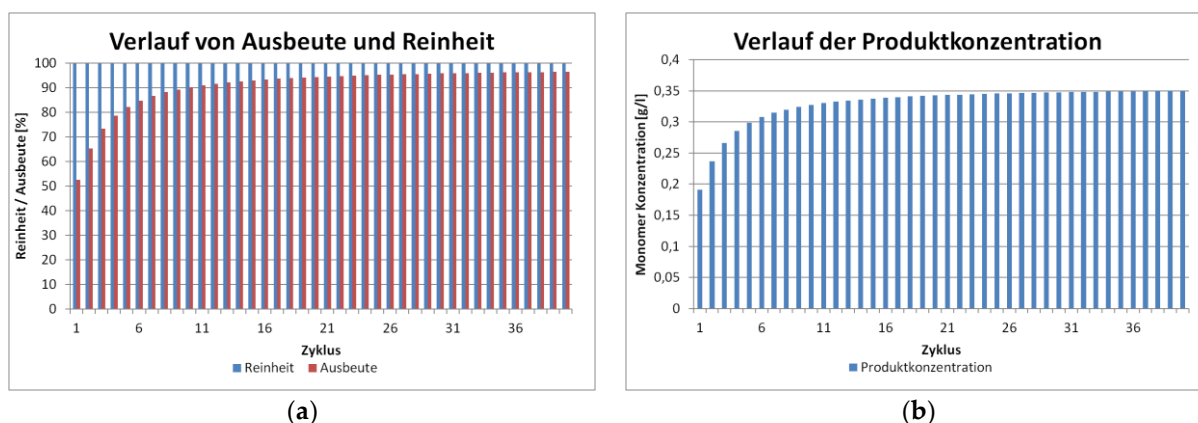


Abbildung 43: iCCC Simulationen, Lauf 3: Verlauf von Ausbeute und Reinheit (a) sowie Monomer Konzentration (b) über die Anzahl der Zyklen.

Für Pharmazeutika hat Produktreinheit oberste Priorität. Die Reinheit bezogen auf die Nebenkomponten können mit Batch als auch mit iCCC Chromatographie erreicht werden. Für hochpreisige Produkte, wie IgG, hat die Ausbeute ebenfalls hohe Priorität. Ausbeute und Reinheit können im Batch Fall nicht getrennt voneinander bestimmt werden. Hohe Reinheit führt in der Regel zu Produktverlust. Im optimierten Fall (Lauf 3) ist die iCCC der Batch Chromatographie hier überlegen.

Aus prozesstechnischer Sicht sind weitere Parameter interessant. Die Produktkonzentration beeinflusst die Apparatedimensionen und Volumenströme der folgenden Grundoperationen. Die Produktkonzentration ist im Fall der iCCC dreimal so groß wie im Batch Fall. Die Verdünnung in Bezug auf die Feedkonzentration entsprechend geringer.

Der Eluentenverbrauch ist in diesen Simulationen für beide Prozesse in etwa gleich. Dies liegt daran, dass die Volumenströme nicht optimiert wurden. Auch wenn die Säulen bei der iCCC Verschaltung theoretisch im Leerlauf sind, werden sie mit dem vollen Volumenstrom durchströmt.

Die Produktivität der iCCC Verschaltung ist in etwa doppelt so groß, wie die der kombinierten Batch-Prozesse. Tabelle 12 fasst alle Prozesskennzahlen für die Batch- und die iCCC- Simulationen zusammen.

Die integrated Counter Current Chromatographie ist demnach, zumindest in den Simulationen, dem Batch Prozess in allen Punkten überlegen.

Tabelle 12: Vergleich der Prozesskennzahlen für den Batch Betrieb und die iCCC Läufe:

		Batch	Lauf 1	Lauf 2	Lauf 3
Reinheit	[%]	99,4	99,9	99,7	99,9
Ausbeute	[%]	80,9	76,7	85,9	96,6
Produktkonzentration	[g/l]	0,13	0,28	0,31	0,35
Verdünnung	[-]	45	21	19	17
Eluentenverbrauch	[l/g]	104	106	100	100
Produktivität	[g/l/d]	1,63	2,81	2,93	2,71

4.2.2 Experimentelle Studien

Auf Grund der guten Simulationsergebnisse wurden auch experimentelle Studien durchgeführt. Diese fanden auf zwei verschalteten LaChrom Elite® Anlagen statt, die auch für die Modellparameterbestimmung benutzt wurden (Siehe Kapitel 3.3). Dabei wurden in einigen hier nicht gezeigten Vorstudien diverse Optimierungen im Vergleich zu den Simulationen durchgeführt. Dies betrifft vor allem eine bessere Taktung der einzelnen Säulen. In den Simulationen liefen diese komplett hintereinander. Erst wenn die Ionenaustausch-Säule ihren Zyklus abgeschlossen hatte, folgte die hydrophobe Interaktionssäule. In den Experimenten wird diese bereits ab dem Moment beladen, wo die entsprechende Fraktion von der IEX Säule eluiert. Es wurden insgesamt 20 Versuche durchgeführt., von denen hier vier gezeigt werden. Die dabei verwendete Nummerierung entspricht nicht der chronologischen Abfolge. Lauf 4 gehört zu den Vorstudien, Lauf 3 ist zwischen Lauf 1 und 2 entstanden. Die gewählte Reihenfolge soll den Entwicklungsprozess zeigen und die zum Betrieb wichtigen Schlussfolgerungen in sinnvoller Abfolge darstellen.

Lauf 1:

Bei dem hier gezeigten ersten Lauf handelt es sich im Prinzip um die Umsetzung des ersten Simulationslaufs. Es wurde auch auf die Anpassung der Salzkonzentration in den Fraktionstanks verzichtet, so dass nicht mit sehr hoher Ausbeute gerechnet wurde. Das Verhältnis von Zielkomponente zu Nebenkomponekte war, anders als bei den Simulationen, jedoch deutlich in Richtung der Nebenkomponekte verschoben. Die IgG-Konzentration entsprach in etwa 50 % der gesamten Proteinkonzentration. Die Chromatogramme dieses Versuchs sind in Abbildung 44 zu sehen.

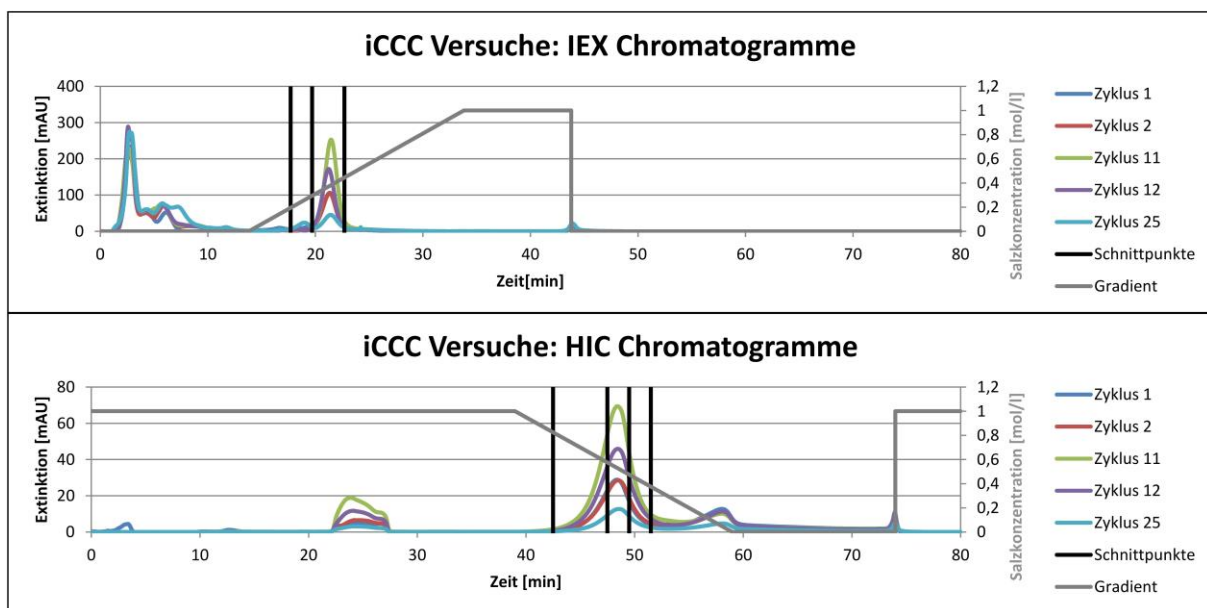


Abbildung 44: iCCC Experimente, Lauf 1: Oben: Chromatogramme der Ionenaustausch-Säule, Unten: Chromatogramme der Hydrophoben Interaktions-Säule.

Die Verläufe aus Abbildung 44 entsprechen nur teilweise den Erwartungen. Bei den HIC Chromatogrammen ist der charakteristische Vorpeak, der in der Beladung mit zu geringer Salzkonzentration bedingt ist, zu erkennen. Der Produktpeak eluiert hier vergleichsweise früh. Für die IEX ist ein sehr ausgeprägter Totzeitpeak zu erkennen. Die Messzeit beginnt mit der Injektion frischer Probe. Dieser Peak enthält also nichtbindende Komponente aus der Feedbrühe.

Am auffälligsten ist jedoch, dass die Peaks in Zyklus 11 am größten sind und von da an sehr schnell kleiner werden. Die Chromatogramme von Zyklus 1 und 2, sowie Zyklus 25 liegen praktisch übereinander.

Zyklus 11 wurde aus einem neuen Vial beladen. Beide Vials stammten aus der gleichen Zellernte und wurden gleich prozessiert. Das vorherige Vial war bereits vor Versuchsbeginn einige Stunden in der Anlage, unter anderem um den Batch-Vergleichsversuch durchzuführen. Es wird angenommen, dass es in den ersten Stunden nach Anbruch einer neuen Probe zu starker Produktdegeneration gekommen ist und dies hier zum einen die großen Peaks von Zyklus 11 als auch die anschließende starke Abnahme erklärt.

Der starke Abfall findet sich auch in den Verläufen der Ausbeute wieder, die in Abbildung 45 dargestellt sind. Abbildung 45 (a) zeigt die Reinheit und Ausbeute die über die SEC Analyse der Produktfraktion ermittelt wurde. Abbildung 45 (b) zeigt den Verlauf der Ausbeute gemessen an den Peakflächen innerhalb der Schnittpunkte der Chromatogramme. Diese zusätzliche Auswertung wurde eingeführt, da die Proben teilweise relativ langen Wartezeiten vor der SEC Analyse ausgesetzt waren. Auch hierbei kann es zu weiteren Zersetzungsprozessen gekommen sein.

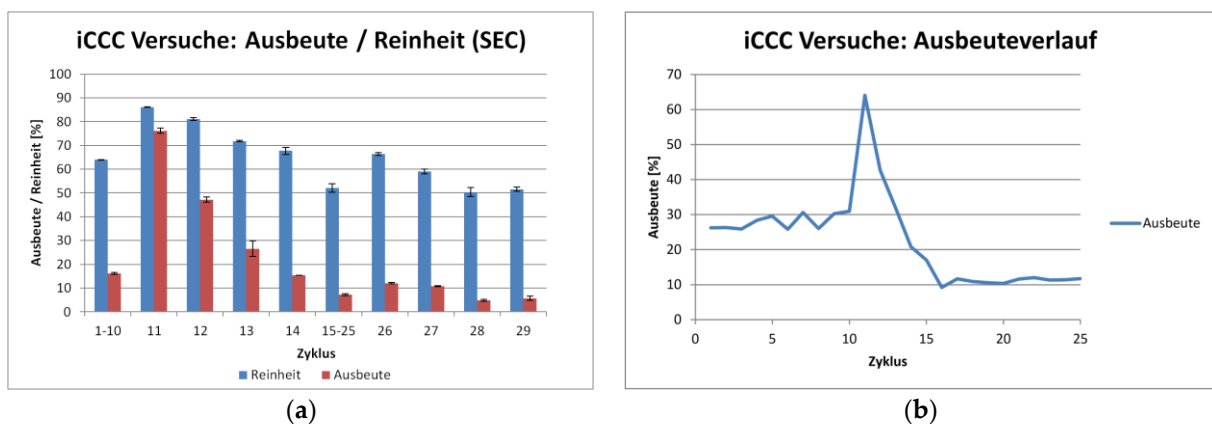


Abbildung 45: iCCC Experimente, Lauf 1: (a) Verlauf von Ausbeute und Reinheit, gemessen mit offline SEC Chromatographie. (b) Verlauf der Ausbeute, gemessen inline über die Peakflächen zwischen den Schnittpunkten.

In Abbildung 45 (a) ist nicht nur eine Abnahme der Ausbeute ab Zyklus 11, sondern auch eine Abnahme der Reinheit festzustellen. Die Ausbeute wird auf die theoretisch injizierte Menge bezogen. Diese beruht auf dem Injektionsvolumen und der Feedkonzentration, gemessen vor dem ersten Zyklus. Ändert sich die Feedkonzentration im Verlauf der Messung, ist dieser Wert wenig aussagekräftig.

Die Abnahme der Reinheit ist ein weiteres Indiz für die Produktzersetzung, in diesem Fall vermutlich während der Wartezeit auf die SEC Analytik. Abbildung

45 (b) zeigt den Verlauf der inline gemessenen Ausbeute. Vor Zyklus 11 liegt diese bei ca. 30 %. Über SEC ermittelt ergibt sich ca. 15 % Ausbeute. Die Zyklen eins bis zehn liefen über Nacht und wurden erst am nächsten Morgen analysiert. Dies könnte den Unterschied erklären. Ab Zyklus 11 stimmen beide Verläufe relativ gut überein. Problematisch ist hierbei, wie bereits erwähnt, dass die Ausbeute auf die Feedmenge bezogen wird, die im ersten Zyklus injiziert wurde.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass in diesem Versuch Reinheiten zwischen 51 % und 86 % mit einem Mittelwert von 65 % erreicht wurden. Die Ausbeute lag bei den ersten Zyklen bei ca. 30 %. Ein Anstieg der Ausbeute, wie es bei den Simulationen beobachtet wurde, fand nicht statt.

Die korrespondierenden Batch-Versuche erreichten eine Reinheit von 54,5 % bei ebenfalls nur 14 % Ausbeute.

Die Produktivität fällt für die iCCC mit ca. 1,7 g/l/d ca. dreimal höher aus als für den Batch Versuch. Der Eluentenverbrauch ist ca. Faktor 3 niedriger. Alle Werte sind am Ende des Kapitels in Tabelle 13 zusammengefasst.

Lauf 2:

Auf Grund der Erfahrungen vom ersten Lauf wurden beim zweiten einige Veränderungen vorgenommen. Um die Feedmenge reduzieren zu können, wurden kleinere Säulen mit ca. 1 ml Adsorbervolumen verwendet (5-50, Atoll GmbH, Weingarten, Deutschland). Das Injektionsvolumen wurde auf 0,099 ml, der Volumenstrom auf 0,5 ml/min reduziert. Ebenso wurde ein steilerer Gradient, mit jetzt 5 CV Länge, verwendet. Zudem wurde der Produktzerfall während des Versuches bestimmt. Dieser folge in etwa einer Reaktion erster Ordnung mit einer Geschwindigkeitskonstante von $k=0,008$. Für die inline Auswertung wurde die angenommene Feedkonzentration für jeden Zyklus entsprechend korrigiert. Die Feedbrühe stimmt in ihrer Zusammensetzung weitgehend mit der Brühe aus den Simulationsstudien überein.

In Anlehnung an die Simulationen (Lauf 3) wurde in diesem Versuch eine Anpassung der Salzkonzentration in den Fraktionsbehältern vorgenommen. Des Weiteren wurden Fraktion der IEX und der HIC, welche beide im nächsten Zyklus auf die IEX geladen werden sollen, in einem Tank zusammengefasst. Die so erzeugten Chromatogramme sind in Abbildung 46 zu sehen.

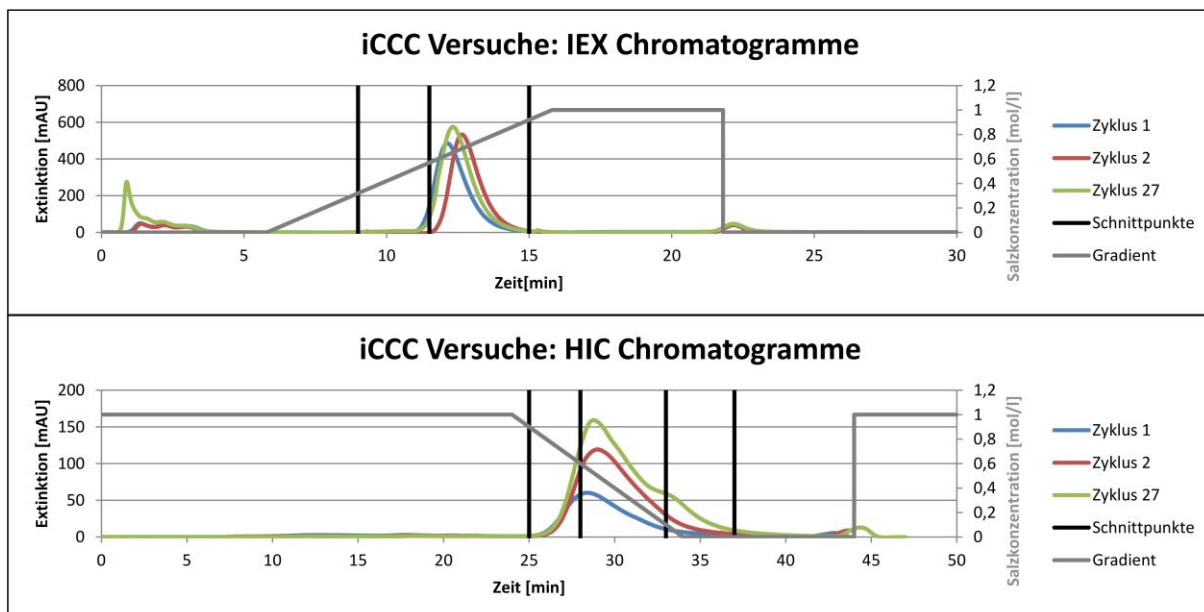


Abbildung 46: iCCC Experimente, Lauf 2: Oben: Chromatogramme der Ionenaustausch-Säule, Unten: Chromatogramme der Hydrophoben Interaktions-Säule.

Abbildung 46 oben: Die Verläufe der Ionenaustausch Chromatographie zeigen nur eine geringe Steigerung der Produktkonzentration. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die erste Fraktion der IEX praktisch kein Produkt enthält. Der erste Zyklus jeder Messreihe wurde manuell gefahren. Die Schnittpunkte wurden nach dem Lauf gesetzt und während des Versuches nicht geändert. Der Grund hierfür ist eine bis dato ungenügende Prozess Analyse Technik. Diese verhinderte eine automatisierte Schnittpunktfindung. Es wurde erwartet, dass sich der IEX Peak auf Grund der von der HIC stammenden Fraktion erhöht und dabei leicht nach vorne wandert. Dann wäre in der ersten IEX Fraktion Produkt fraktioniert worden und der Peak hätte sich weiter erhöht. In hier nicht aufgeführten Versuchen wurde dieses Phänomen beobachtet.

Abbildung 46 unten: Wie auch in den Simulationsstudien verhindert die Anpassung der Salzkonzentration in den Fraktionstanks den Vorpeak. Der Produktpeak nimmt in den ersten Zyklen zu. Alle drei Fraktionen zusammen enthalten scheinbar das gesamte Produkt, so dass hohe Ausbeute erwartet wird.

Die Verläufe von Ausbeute und Reinheit sind in Abbildung 47 dargestellt.

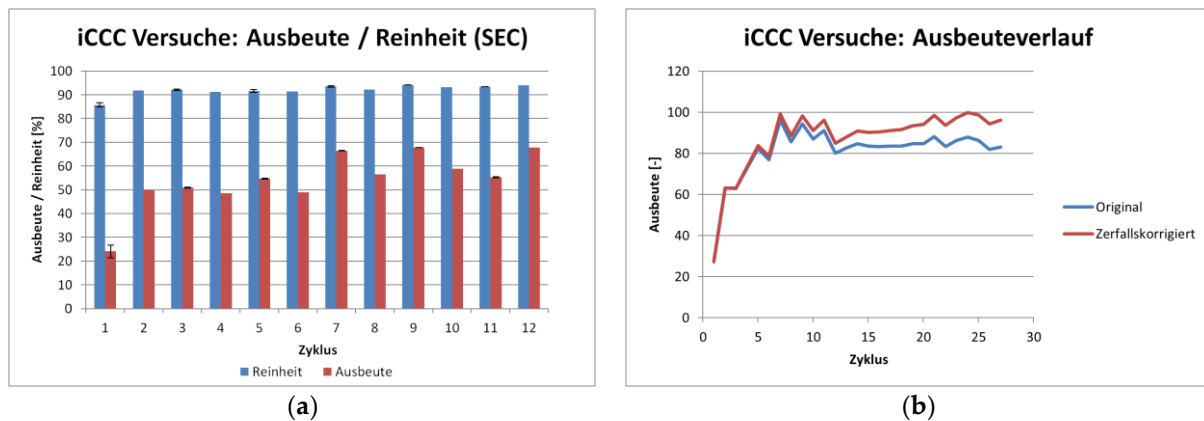


Abbildung 47: iCCC Experimente, Lauf 2: (a) Verlauf von Ausbeute und Reinheit, gemessen mit offline SEC Chromatographie. (b) Verlauf der Ausbeute, gemessen inline über die Peakflächen zwischen den Schnittpunkten.

Abbildung 47 (a) zeigt die Ausbeute und Reinheit der Produktfraktion ermittelt mit SEC Analysen. Die Reinheit liegt hier im Schnitt bei 93 %, die Ausbeute bei ca. 60 %. Ob und in wie weit Produktdegeneration hier eine Rolle spielt, konnte nicht festgestellt werden. Der Verlauf der Ausbeute gemessen über die Peakfläche zwischen den Schnittpunkten (Abbildung 47 (b)) ergibt ab Zyklus 5 eine Ausbeute von im Mittel 85,9 % (blaue Kurve). Wird der Zerfall des IgG während der Versuchslaufzeit berücksichtigt, ergäbe sich ein Wert von 93 % (rote Kurve). Die Produktivität liegt bei 7,1 g/l/d (7,8 g/l/d korrigiert) bei einem Eluentenverbrauch von 51,8 l/g (korrigiert 47,3 l/g). Diese Werte sind sowohl besser als jene vom ersten Lauf als auch besser als die Ergebnisse der Simulationsstudien. Dies liegt an der optimierten Fahrweise.

Der Batch Versuch zu dieser Messreihe hatte eine Reinheit von 85,9 % bei einer Ausbeute von 65,1 %. Die Produktivität betrug 2,2 g/l/d bei einem Eluentenverbrauch von 169 l/g.

Die Konzentration der iCCC Produktfraktion ist ca. um den Faktor 6 höher als für den Batch Lauf. Auch diese Ergebnisse sind nochmal in Tabelle 13 zusammengefasst.

Grundsätzlich lassen die Ergebnisse darauf schließen, dass mit der iCCC eine deutlich effizientere Aufreinigung der IgG Fermentationsbrühe möglich ist. Der Prozess ist allerdings auch auf Grund zusätzlicher Prozessparameter, wie z.B. der Fraktionsschnittpunkte, komplizierter in der Auslegung und im Betrieb. Dies wird durch die folgenden zwei Beispiele verdeutlicht:

Schwingender Betrieb:

In den Verläufen der vorherigen Versuche ist teilweise ein Schwingen der Ausbeute zu sehen. Dies kann im Extremfall das Erreichen eines stationären Zustands verhindern.

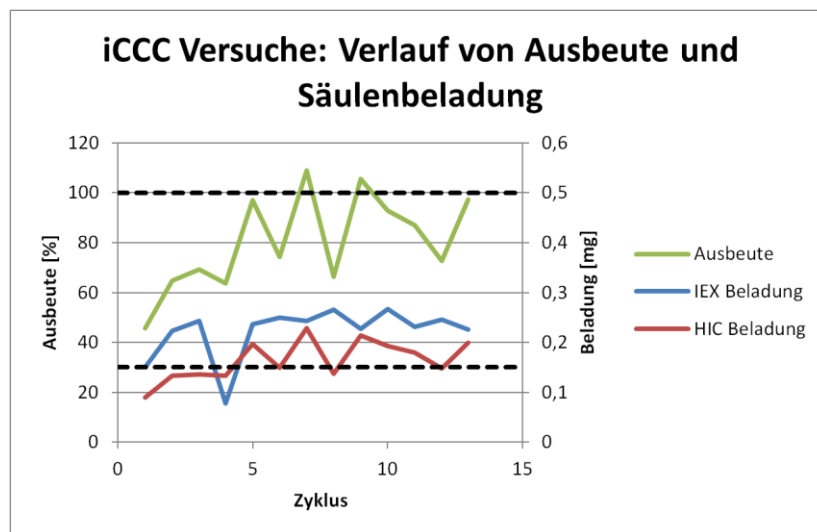


Abbildung 48: iCCC Experiment, Lauf 3: Verlauf von Ausbeute (grün) sowie der Beladung der Ionenaustausch-Säule (blau) und Hydrophoben Interaktions-Säule (rot). Die gestrichelten Linien geben 100 % Ausbeute (oben) bzw. die Beladung der Säule im Batch Fall (unten) an.

Abbildung 48 zeigt als grüne Kurve den Verlauf der Ausbeute für diesen Fall. Wie zu sehen ist, steigt die Ausbeute zunächst an. Ab Zyklus 6 schwingen die Ausbeute und damit die Produktkonzentration um über 20 %. Teilweise werden Werte über 100 % Ausbeute erreicht.

Ursächlich dafür ist der Austausch des Produktes zwischen der Ionenaustausch- und der hydrophoben Interaktionschromatographie bei gleichzeitig ungünstig gewählten Schnittpunkten. Wie in Abbildung 49 zu sehen ist, wird auf der IEX in etwa der halbe Produktpeak fraktioniert und im nächsten Zyklus wieder auf die IEX geladen. Dadurch steigt die Beladung der Säule stark an. Dies führt auch zu steigender Konzentration in der Fraktion, die auf die HIC geladen wird. Dies wiederum führt auch hier zu einem größeren Peak. Daraus resultiert mehr Produkt in der Fraktion, die einen Zyklus später wieder auf die IEX geladen wird.

Es resultiert eine Produktmasse, die zwischen den Säulen hin und her schwingt, jeweils um einen Zyklus verschoben. Dies ist auch in Abbildung 48 zu erkennen. Hier ist in rot bzw. blau die Beladung der Ionenaustausch- bzw. Hydrophoben Interaktions-Säule dargestellt. Auch diese schwingen um einen Mittelwert, jedoch sind die Maxima der HIC um einen Zyklus zu denen der IEX

verschoben. Ursächlich für dieses Phänomen sind nicht ideal gesetzte Schnittpunkte. Diesem Problem könnte durch eine dynamische Anpassung der Schnittpunkte mittels fortschrittlicher Prozessautomatisierung begegnet werden.

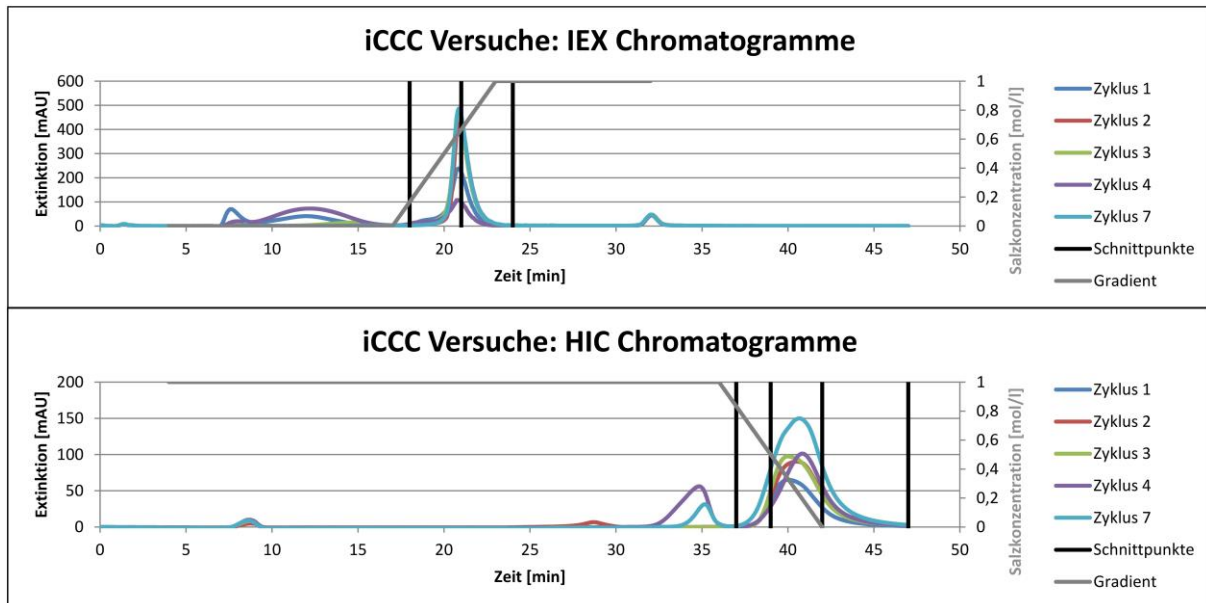


Abbildung 49: iCCC Experimente, Lauf 3: Oben: Chromatogramme der Ionenaustausch-Säule, Unten: Chromatogramme der Hydrophoben Interaktions-Säule.

Ein ebenfalls mittels Prozessautomatisierung zu lösendes Problem ist in Abbildung 50 zu sehen. Hier stimmt das Chromatogramm des ersten Zyklus nicht mit denen der restlichen Verläufe überein. Der Lauf musste nach Zyklus 2 abgebrochen und mit veränderten Parametern neu gestartet werden. Dieser Lauf gehört zu den Vorstudien. Er wurde unter ähnlichen Bedingungen durchgeführt, wie Lauf 1. Es ist ein starker Anstieg der Produktkonzentration in der IEX zu sehen. Die Konzentration steigt hier um den Faktor 8 an. Auf der HIC beträgt der Anstieg nur ca. Faktor 6. Dies liegt vor allem an dem sehr ausgeprägten Vorpeak, der auch zu hohen Produktverlusten führt.

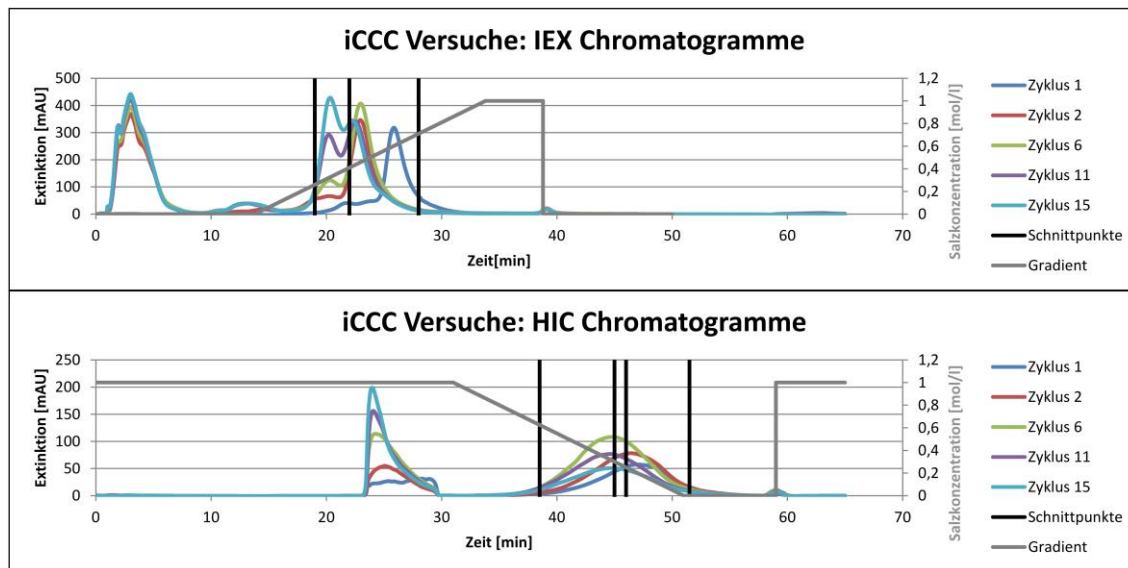


Abbildung 50: iCCC Experimente, Lauf 4: Oben: Chromatogramme der Ionenaustausch-Säule, Unten: Chromatogramme der Hydrophoben Interaktions-Säule.

4.2.3 Zusammenfassung und Ausblick

Sowohl die Simulationsstudien als auch die Experimente haben gezeigt, dass die integrated Counter Current Chromatographie Verschaltung der Batch Chromatographie überlegen ist. Die Ergebnisse für die experimentellen Studien sind in Tabelle 13 zusammengefasst. Die Werte für Lauf 2* sind gegenüber Lauf 2 entsprechend dem IgG Zerfall korrigiert.

Tabelle 13: Parameter, Ergebnisse und Kenngrößen der exp. Studien:

		Lauf 1	Lauf 2	Lauf 2*	Lauf 3
Feedkonzentration	[mg/ml]	5	5,74		6
Injektionsvolumen	[ml]	1	0,099		0,025
Injektionsmenge	[mg]	5	0,57		0,15
Volumenstrom	[ml/min]	2	0,5		0,5
Säulendurchmesser	[cm]	1	0,5		0,5
Säulenlänge	[cm]	10	5		5
Säulenvolumen	[ml]	7,85	0,98		0,98
iCCC:					
Laufzeit gesamt	[min]	80		50	45
Ausbeute	[-]	0,3	0,85	0,93	0,89
Produktivität	[g/l/d]	1,72	7,08	7,75	2,18
Eluentenverbrauch	[l/g]	106,67	51,79	47,33	168,54
Batch:					
Laufzeit gesamt	[min]	125		125	
Ausbeute	[-]	0,14		0,65	
Produktivität	[g/l/d]	0,52		2,17	
Eluentenverbrauch	[l/g]	355,87		169,04	

Bei vergleichbarer oder höherer Reinheit kann über die iCCC Verschaltung im Vergleich zum Batch Prozess zwischen 15 % und 28 % mehr absolute Ausbeute erreicht werden. Relativ gesehen entspricht das einer Steigerung um 113 % für Lauf 1 und 42 % für Lauf 2. Die Produktivität liegt dabei um bis zu 233 % höher. In ähnlichen Studien z.B. für die Zweisäulen MCSGP, wurden vergleichbare Werte erreicht [Müller-Späth 2010, Steinebach 2016]. Der direkte Vergleich der Prozesse ist jedoch schwierig, da die meisten anderen Konzepte einzelne Prozessschritte ersetzen, die iCCC Verschaltung jedoch zwei Aufreinigungsschritte kombiniert.

In der iCCC werden zwei Säulen verschaltet, die bereits in vielen Plattformprozessen vorhanden sind. Der apparative Aufwand zur Umsetzung des Konzeptes ist vergleichsweise gering. Alle anderen, bekannten kontinuierlichen Chromatographieprozesse benötigen eine höhere Anzahl an Säulen, verglichen mit dem Batch Prozess.

In vergleichbaren Studien zur Umsetzung kontinuierlicher Chromatographieverfahren wird in der Regel nur ein Chromatographieschritt betrachtet. Diesem folgt häufig ein Pufferwechsel, der in Studien über kontinuierliche Chromatographie nicht immer berücksichtigt wird. Gerade nach der Ionenaustausch Chromatographie ist in der Regel ein Pufferwechsel nötig, da das Produkt in relativ hoher Salzkonzentration eluiert. Die hierfür benötigten Prozesszeiten und Puffermengen sind nicht unerheblich. Diese entfallen im Falle des iCCC Konzeptes komplett. Von der IEX wird direkt auf die HIC geladen, die Elution von der Hydrophoben Interaktions-Säule erfolgt annähernd salzfrei.

Die Umsetzung der Verschaltung würde, wie es für alle kontinuierlichen Fahrweisen gilt, vor allem durch ein hohes Maß an Automatisierung begünstigt. Diese müsste in der Lage sein, die Schnittpunkte für die Fraktionen selbst zu erkennen. Dem steht das chromatographietypische Problem sich überlagernder Peaks entgegen. Diesem soll über UV/VIS Spektraldaten Analyse begegnet werden. Dies wird in Kapitel 5 vorgestellt.

4.3 Kontinuierliche Membranchromatographie

Membranchromatographie Module sind in der Regel auf den „single use“ und „disposable“ Gedanken ausgelegt. Der Einbau eines Moduls ist in der Regel schnell und unkompliziert. Reinigung, Sterilisation und große Teile der Säulencharakterisierung und Dokumentation entfallen. Dies ist für den Einsatz in Mehrzweckanlagen ideal. Der Einsatzbereich ist jedoch auf Grund der geringen Beladungskapazität und begrenzter Modulgrößen im Batch Betrieb eingeschränkt. Im Vergleich zur konventionellen Chromatographie können jedoch deutlich größere spezifische Volumenströme gefahren werden. Eine kontinuierliche Prozessführung mit sehr vielen, sehr schnellen Zyklen könnte die geringe Kapazität kompensieren und so einen größeren Einsatzbereich für Membranadsorber ermöglichen. Als mögliche Prozessvarianten werden die iCCC und eine sequentielle Verschaltung untersucht.

Für die Evaluierung der beiden Verschaltungsmöglichkeiten wurden simulationsgestützte Konzeptstudien durchgeführt. Dafür wurden die in Kapitel 3 vorgestellten, parametrisierten und validierten Modelle von Nano Modulen verwendet. Diese sind bestimmungsgemäß für den Einsatz zur Probenvorbereitung im Labor vorgesehen. Dies ist für Konzeptstudien unproblematisch. Die Membrane der Labormodule unterscheiden sich nicht von jenen der Prozessmodulen der gleichen Modellfamilie. Somit sind die Isothermen für beide Bauformen gültig. Auch die Anzahl an Membrananlagen ist identisch, so dass keine Unterschiede in der spezifischen Kapazität bestehen sollten. Unterschiedliche fluiddynamische Eigenschaften der Module sollten bei der Prozessauslegung berücksichtigt werden, sind für die Konzeptstudien aber von untergeordneter Bedeutung.

4.3.1 integrated Counter Current Chromatography

In Anlehnung an die Ergebnisse der iCCC für partikuläre Chromatographie sollte dieses Konzept auch für Membranadsorber getestet werden. Zu diesem Zweck wurde ein Ionenaustausch- mit einem Hydrophoben Interactions-Modul verschaltet. Die Simulationsergebnisse für Zyklus 1 und 10 sind in Abbildung 51 abgebildet.

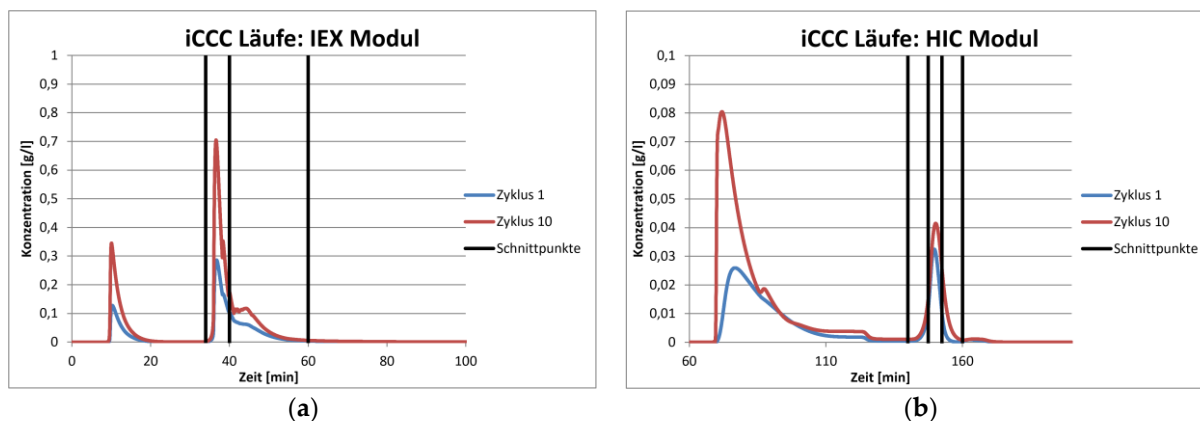


Abbildung 51: Simulierte iCCC Verläufe: (a) Ionenaustausch-Modul; (b) Hydrophobe Interaktions-Modul.

Für die verwendeten Module konnte bei dem gegebenen Stoffsystem kein sinnvoller Arbeitspunkt ermittelt werden. Dies ist vor allem auf das Tailing der Ionenaustausch-Läufe zurückzuführen. Abbildung 51 (a) zeigt die Chromatogramme für dieses Modul. Zu sehen ist ein steiler Anstieg des Peaks gefolgt von einem sehr langen, flach abfallenden Verlauf. Die schwarzen Linien zeigen die Lager der Schnittpunkte an. Zwischen der ersten und zweiten Linie liegt die Fraktion, die im nächsten Zyklus auf das IEX Modul geladen wird. Die nächste Fraktion wird auf die HIC geladen. Auf Grund der sehr steilen Konzentrationsfront ergibt sich ein Optimierungsproblem. Schon bei relativ geringer Fraktionsbreite liegt ein Großteil des Produktes innerhalb dieser Fraktion. Es wird wenig Produkt auf die Hydrophobe Interaktions-Membran geladen. Das Produkt sammelt sich vermehrt in dem Ionenaustausch-Modul an und übersteigt schon nach wenigen Zyklen dessen Kapazität. Eine Verringerung der Fraktionsbreite führt jedoch zu so geringen Volumina, dass diese prozesstechnisch nicht mehr sinnvoll sind. Damit würde dieser Wiederbeladungsschritt entfallen.

Bei der beispielhaft in Abbildung 51 gezeigten Wahl der Schnittpunkte wird nur wenig Produkt auf die HIC-Membran geladen (Abbildung 51 (b)). Dies führt insgesamt zu einem relativ schmalen Peak und damit zu insgesamt kleinen Fraktionen. Die erste Fraktion wird im nächsten Zyklus auf die HIC geladen. Die Fraktion zwischen Schnittpunkt 2 und 3 ist die Produktfraktion. Die letzte Fraktion wird auf die IEX geladen. Die zum Wiederbeladen vorgesehenen Fraktionen 1 und 3 enthalten in diesem Fall so gut wie kein Produkt. Dies verhindert eine Konzentrationssteigerung und führt letztlich zu einem dem Batch Prozess ähnlichen Verlauf.

Grundsätzlich sind zwar die bei der Partikelchromatographie gefundenen Vorzüge in Grundzügen vorhanden, jedoch nicht so deutlich ausgeprägt. Verglichen mit zwei einfachen Batch-Läufen sind die Vorteile für dieses Stoffsystem und diesen Modultyp vernachlässigbar und würden den Mehraufwand nicht rechtfertigen.

4.3.2 Sequentielle Chromatographie

Die Machbarkeitsstudien für eine sequentielle Verschaltung wurden mit dem Ionenaustausch-Modul durchgeführt. Zunächst wurde die Kapazitätssteigerung in Abhängigkeit von der Anzahl an Modulen in der Reihenschaltung ermittelt. Dabei wurde das erste Modul der Reihe so lange beladen, bis der Durchbruch auf dem letzten Modul der Reihe erfolgte. Die Beladungskapazität der Module ist abhängig vom Volumenstrom. Der empfohlene Volumenstrom für diese Module liegt bei 5 CV/min, muss jedoch bei der Verwendung mehrerer Module in Reihe reduziert werden, um das Drucklimit von 4 bar nicht zu übersteigen. Die Ergebnisse für einen Volumenstrom von 3 CV/min sind in Abbildung 52 zusammengefasst. Die blauen Säulen entsprechen der Proteinbeladung des ersten Moduls. Die roten Säulen zeigen die Steigerung im Vergleich zum Batch-Prozess an. Wie zu erwarten ist, steigt die Kapazität anfangs stark an und entwickelt sich dann mit abnehmender Tendenz. Die Steigerung zwischen einem und zwei Modulen liegt bei 34 %. Nach 7 Modulen beträgt die Zunahme nur noch 4 % oder weniger.

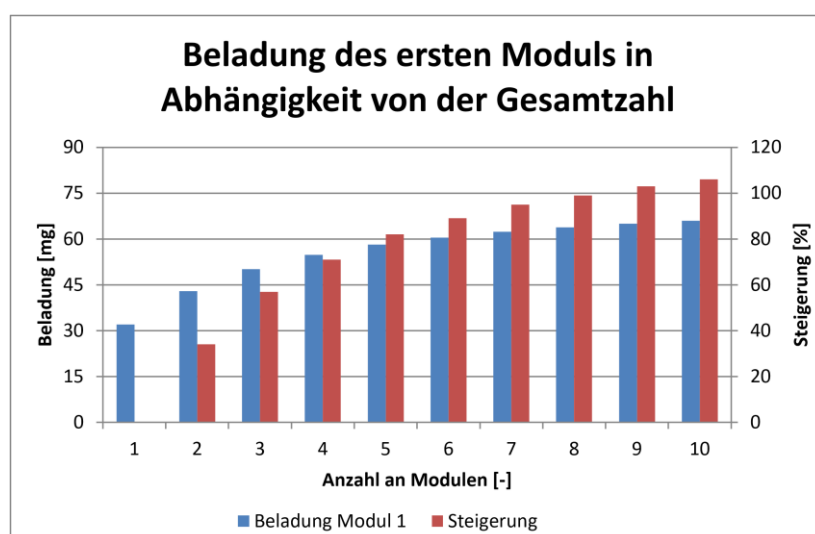


Abbildung 52: Einfluss der Anzahl an Modulen auf die Beladung des ersten Moduls in der Kette. Blaue Säulen: Beladung des Moduls; Rote Säulen: Steigerung bezogen auf eine Säule.

Die ideale Anzahl an Säulen für den Prozess ist nicht nur abhängig von der Beladungskapazität. Wie bereits erwähnt wurde, erhöht jedes Modul den gesamten Druckverlust. Um die maximal zulässigen 4 bar am ersten Modul nicht zu übersteigen, ist es daher nötig, den Volumenstrom im Beladungsschritt zu reduzieren. Dies verlängert den Prozess und reduziert die Produktivität. Die Abhängigkeit des Druckverlusts eines Moduls vom Volumenstrom ist in Abbildung 53 zu sehen.

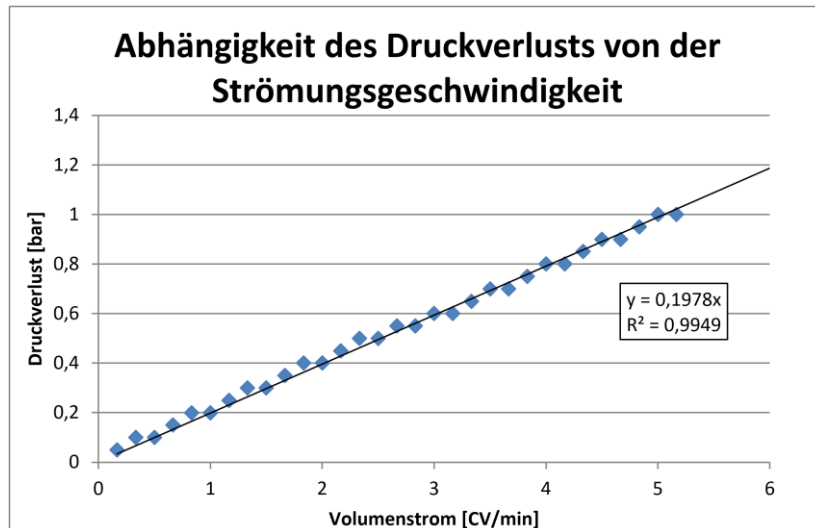


Abbildung 53: Experimentelle Bestimmung des Druckverlusts über ein Modul in Abhängigkeit vom Volumenstrom.

Die optimale Konfiguration hängt vom Anwendungsfall ab. In den folgenden Fallstudien wird der Batch Prozess mit dem sequentiellen Prozess verglichen. Der Bezugspunkt ist eine gleiche jährliche Gesamtproduktion von IgG. Es werden drei Fälle unterschieden. Allen gemein ist ein Upstream im Fed-Batch Betrieb mit einem IgG Titer von 5 g/l. Es werden drei Fermenter-Größen betrachtet: 20 l, 200 l und 2000 l. Die Anzahl an Zellernten pro Jahr liegt bei 40. Angenommen, dass kein Produktverlust auftreten würde, ergäbe das eine maximale Jahresproduktion von 4 kg, 40 kg bzw. 400 kg IgG [Sommerfeld 2005, Subramanian 2015, Subramanian 2017].

Das Elutionsprofil ist für den Batch und den sequentiellen Prozess identisch. Nach der Injektion des Feed-Gemischs folgt ein 3 CV Waschschrift, gefolgt von 6 CV Gradient, 3 CV Regeneration und 3 CV Re-Equilibrierung. Der Volumenstrom liegt bei 5 CV/min. Dieser muss auch für den sequentiellen Prozess nicht reduziert werden, da sich jedes Modul nach der Beladung

einzelnen in diesen Schritten befindet. Das Modul ist nicht mehr mit den anderen Modulen verbunden.

Die Anzahl an Modulen im kontinuierlichen, sequentiellen Prozess wurde anhand einer Optimierungsstudie auf vier Module festgelegt. Weniger Module bieten weniger Beladungskapazität, mehr Module führen zu geringeren Volumenströmen bei nur noch marginaler Steigerung der Beladung. Bei vier Modulen erfolgt die Feedbeladung mit 3 CV/min. Daraus ergeben sich insgesamt 2,4 bar Rückdruck der Module (vgl. Abbildung 53). Zusammen mit dem Druckverlust der Anlagenteile nach den Modulen ergibt sich daraus ein Druck von 3,5 bar am ersten Modul. Es bleiben 0,5 bar Sicherheitsabstand zu den maximal möglichen 4 bar. Die Feedbeladung im Batch-Prozess erfolgt, wie der Rest der Methode, mit 5 CV/min.

Einige Prozessparameter und Ergebnisse für die drei unterschiedlichen Fälle sind in Tabelle 14 zusammengefasst. Die Steigerung der Beladung liegt für vier Module bei 71 % im Vergleich zum Batch Prozess. Auf Grund des langsameren Volumenstroms, aber auch auf Grund der höheren Kapazität dauert der Beladungsvorgang im kontinuierlichen Fall länger. Damit dauert der gesamte Zyklus eines Moduls im kontinuierlichen Prozess insgesamt länger im Vergleich zum absatzweisen Betrieb. Die Kapazitätssteigerung wirkt sich jedoch insgesamt positiver auf den Prozess aus, so dass die Produktivität des kontinuierlichen Prozesses insgesamt um 48,5 % über der des Batch Prozesses liegt. Dieser Wert bezieht sich nur auf die Dauer eines Zyklus. Die Aufreinigung des gesamten Fermentervolumens ist jedoch mit dem sequentiellen Verfahren in insgesamt weniger Schritten möglich. Die gesamte Prozesslaufzeit zur Aufreinigung einer Zellernte ist hier um 32,7 % geringer. Bezieht man dies in die Berechnung der Produktivität mit ein, ist diese für den kontinuierlichen Fall um 71 % höher als für den klassischen Prozess.

Die Größe der verwendeten Module stellt für den sequentiellen Prozess einen weiteren Freiheitsgrad dar. Ein stabiles Produkt vorausgesetzt, ist es vorteilhaft, den Prozess auf den kompletten Zeitraum zwischen zwei Zellernten auszulegen. Dies reduziert die Stillstandszeiten der Anlage enorm und erlaubt noch dazu die Verwendung deutlich kleinerer Module. Sowohl die 20 l als auch die 200 l Fermenter können mit 150 ml Modulen anstelle der 5 l Module aufgearbeitet werden. Dies entspricht einer Volumenverkleinerung um den Faktor 30. Die Gesamtlaufzeit ist dabei mit ca. 4 h bzw. ca. 37 h noch relativ

gering. Mit etwas Optimierung des Elutionsprofils ist es für den 20 l Fermenter möglich, diesen mit den 3 ml Modulen zu prozessieren. Mit den gegebenen Daten würde dies 7,5 Tage dauern. Bei einer Reduktion des Wasch- und des Gradienten-Schritts um jeweils ein CV wären weniger als 7 Tage möglich.

Neben einer höheren Produktivität ist für den kontinuierlichen Prozess auch ein geringerer Eluentenverbrauch festzustellen. Dieser liegt bei 38 % weniger. Da die eigentliche Trennung für beide Prozesse fast identisch ist, konnten keine Unterschiede in der Ausbeute oder Reinheit zwischen beiden Prozessvarianten festgestellt werden.

Alle Parameter und Ergebnisse der vorgestellten Prozesse sind in Tabelle 14 zusammengefasst:

Tabelle 14: Prozessparameter und Ergebnisse für die IgG Fallstudien:

		20 l Fermenter			200 l Fermenter			2000 l Fermenter	
		Batch	Sequentiell		Batch	Sequentiell		Batch	Sequentiell
Adsorbervolumen gesamt	(l)	15	9		150	88		1500	877
Modulgröße	(l)	5	0,15	0,003	5	5	0,15	5	5
Anzahl Module pro Zyklus	(-)	1	4	4	1	4	4	1	4
Läufe/Zyklen	(-)	3	15	731	30	4	146	300	44
Prozesslaufzeit gesamt	(h)	0,16	3,66	163,74	1,63	1,10	36,65	16,33	10,99
Produktivität									
Lauf/Zyklus	(g/l/d)	2939	4366		2939	4366		2939	4366
Ernte zu Ernte	(g/l/d)	1,11	1,90		1,11	1,90		1,11	1,90
Eluentenverbrauch	(l/g)	2,59	1,52		2,59	1,52		2,59	1,52

4.3.3 Zusammenfassung und Ausblick

Die modellbasierte Evaluation von kontinuierlichen Prozessen ist ein schneller und effizienter Weg. Für die gegebenen Module zeigten sich die bekannten Modelle als ungeeignet. Es wurde daher ein neuer Modellierungsansatz, vor allem in Bezug auf die Fluidodynamik, gewählt. Das Model konnte mit entkoppelten Versuchen sowohl für die Fluidodynamik als auch für den Stofftransport inkl. Gleichgewicht validiert werden. Dabei zeigte sich, dass noch Optimierungspotenzial bei der Bestimmung der fluiddynamischen Parameter der einzelnen Modulbereiche besteht [Zobel-Roos 2018].

Bei den bisher verwendeten Modulen handelt es sich um Labormodule für die Probenvorbereitung. Die Übertragbarkeit des Modellierungsansatzes sollte noch mit Scale-Up Versuchen auf größere Module untersucht werden.

Die Konzeptstudien haben gezeigt, dass eine integrated Counter Current Chromatography Verschaltung mit den gegebenen Modulen bei dem verwendeten Stoffsystem keine Vorteile zum Batch-Prozess bringt. Die Ursache dafür ist vor allem die sehr unsymmetrische Peakform. Diese scheint bauartbedingt von der Modulgeometrie verursacht zu werden. Zur Überprüfung der von den Membranen selbst hervorgerufenen Asymmetrie wurden 30 Lagen von Stanzlingen mit einem Durchmesser von 1 cm in eine Chromatographie-Glassäule (Superformance[®] 300-10, Götec-Labortechnik GmbH, Bickenbach, Deutschland) gepackt und mit den Stempeln leicht angepresst. Es wurden Chromatographieversuche unter den gleichen Bedingungen (IgG Brühe, NaPi Puffer, etc.) gefahren, die auch für alle anderen Membranchromatographie Versuche verwendet wurden. Daher waren auch die Isothermen bereits bekannt. Simulationen des Trennvorganges wurden unter Annahme einer axial durchströmten Säule bei sonst gleichen Parametern wie vom Membranadsorbermodell bekannt durchgeführt (1D Säule). Alle sonstigen fluiddynamischen Aufteilungen entfallen. Die resultierenden Verläufe für die Messung und die Simulation sind in Abbildung 54 zu sehen.

Es ist zu erkennen, dass absolut symmetrische Peaks entstehen und dass diese durch das vereinfachte Modell gut nachgebildet werden können. Eine Änderung der Modulbauweise und eine Annäherung an das gezeigte Prinzip wären aus prozesstechnischer Sicht zu prüfen [Fröhlich 2012].

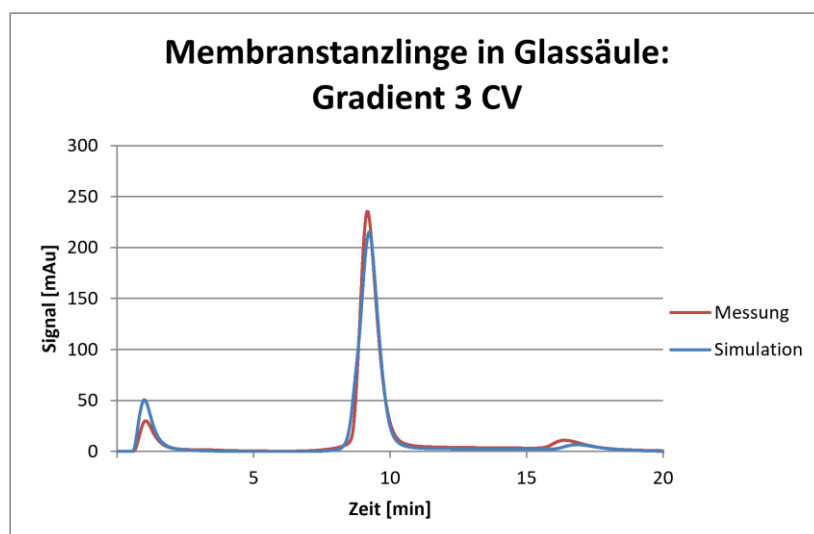


Abbildung 54: Vergleich zwischen Messungen und Simulationen für mehrere Membranlagen in einer Glassäule.

Die Fallstudien für eine sequentielle Verschaltung ergaben für den optimierten Fall einer Sequenz aus vier Adsorber-Modulen eine Kapazitätssteigerung um 71%. Bezogen auf den einzelnen Lauf ist weiterhin eine 48,5 %ige Steigerung der Produktivität bei 38 % geringerem Pufferverbrauch festzustellen. Die gesamte Prozesszeit lässt sich, bei der Verwendung gleich großer Module im Batch und kontinuierlichen Fall, um 32,7 % reduzieren. Damit ist die Produktivität über den gesamten Prozess betrachtet für kontinuierliche Fahrweise um 71 % höher.

Weiterhin wäre eine Optimierung durch Nutzung deutlich kleinerer Module bei dafür längerer Prozesslaufzeit möglich. Dies würde Stillstandszeiten von Anlagen und den Anlagen-Footprint deutlich reduzieren.

Die Fallstudien gingen von Fed-Batch Fermentationen aus. Eine Anwendung auf kontinuierliche Perfusionsreaktoren wurde bisher nicht überprüft. Da diese jedoch relativ geringe Produktströme abgeben, dürfte das Potenzial für Membranchromatographie als Alternative zu klassischer, partikulärer Chromatographie hier groß sein. Die Module sollten in der sequentiellen Fahrweise ausreichend Kapazität bei vergleichsweise niedrigen Kosten bieten. Ebenso bietet sich eine „Disposable Strategie“ an.

5. Prozessanalytische Technologie

In den vorangegangenen Kapiteln konnten die Vorteile von kontinuierlichen Chromatographieprozessen gezeigt werden. Diese beruhen in der Regel auf der Verschaltung mehrerer Säulen. Häufig ist das Umschalten von einer Säule auf die andere oder von einem Tank auf den anderen dabei der entscheidende Schritt für die Effektivität des Prozesses. Die Bestimmung dieser Takt- oder Schnittpunkte stellt bei der Auslegung und dem Betrieb eine der schwierigsten Aufgaben dar. Diese könnte über die Kenntnis des realen Konzentrationsverlaufs in für die Prozessregelung hinreichend kurzer Zeit deutlich vereinfacht werden.

Der Wandel der industriellen Fertigung im Zuge der vierten industriellen Revolution ist zudem geprägt von hochgradig automatisierten Prozessen und selbstlernenden Systemen. Um dieses zu erreichen, ist vor allem das Erkennen des Ist-Zustandes von entscheidender Bedeutung. Dies stellt für Chromatographische Prozesse, egal ob analytisch oder präparativ, häufig ein großes Problem dar [Degerman 2008, Gey 2008].

In der Regel messen die in der Chromatographie eingesetzten Detektoren nur ein Summensignal, aus dem sich nicht direkt auf die Konzentration der Einzelkomponenten schließen lässt. Dies ist für den gesamten Bereich der Chromatographie problematisch. Im Bereich der analytischen Chromatographie wird hoher Aufwand betrieben, um die Einzelkomponenten bis zur Basislinie voneinander zu trennen, um anschließend über die Peakfläche auf den Gesamtgehalt schließen zu können [Engelhardt 1986, Henke 1999]. Die direkte Bestimmung der Konzentrationen am Kolonnenausgang und damit die Entfaltung der überlappenden Peaks würde viel Zeit und Kosten ersparen.

Im Bereich der präparativen, insbesondere kontinuierlichen Chromatographie, wäre eine Basislinientrennung zu unproduktiv. Der Prozess ist auf eine schnelle Trennung mit maximaler Adsorbenausnutzung und minimalem Lösemittelverbrauch optimiert. Dies führt fast ausnahmslos zu überlappenden Peaks. Dabei wird zur Gewährleistung der Reinheit häufig ein Ausbeuteverlust in Kauf genommen. In der Regel sind auch hier die echten Konzentrationsverläufe unbekannt, so dass nicht datenbasiert fraktioniert werden kann. Die Schnittpunkte werden empirisch aus Versuchen bestimmt

und mit einem Sicherheitszuschlag umgesetzt. Dies erhöht den Produktverlust.

Das Problem verstärkt sich, wenn kontinuierliche oder zyklische Prozesse vorliegen. Hier summieren sich kleine Abweichungen mit der Zeit auf. Summensignale, wie bei klassischer UV-Detektion, geben hier zwar gute Richtwerte, häufig muss der reale Verlauf dennoch offline analysiert werden.

Die Erkennung der Kolonnen-Ausgangskonzentrationen stellt daher für den gesamten Bereich der Chromatographie ein interessantes Problem dar. Diesem kann zumindest für UV/VIS aktive Komponenten mit Spektraldatenanalysen begegnet werden.

Zudem kann damit die Prozessauslegung vereinfacht und beschleunigt werden. Der Vergleich und die Validierung von Simulationsergebnissen mit Experimenten sind dafür exemplarisch. Die Simulationen liefern Konzentrationsverläufe aller simulierter Komponenten. Dies ist im Experiment häufig nur durch Fraktionierung des gesamten Chromatographielaufs und anschließender Analytik zu erreichen.

5.1 Inline Concentration Measurement

Unter dem Begriff "Inline Concentration Measurements" kurz ICM werden in dieser Arbeit mehrere Ansätze zusammengefasst, die Konzentrationen von UV/VIS aktiven Komponenten über die Entfaltung des UV/VIS Summenspektrums inline zu bestimmen. Die beschriebenen Methoden sind dabei in einem institutseigenen Tool zusammengefasst, siehe auch: [Zobel-Roos 2017].

5.1.1 Stand der Technik

Das Problem der überlagernden Peaks ist so alt wie die Chromatographie selbst. Es wurden daher schon früh Lösungsansätze hierfür gesucht. Grundsätzlich lassen sich diese in zwei Bereiche aufteilen. Offline / at-line Methoden und inline Methoden.

Ein offline Ansatz besteht darin, den Chromatographielauf in mehrere Fraktionen zu unterteilen. Diese Fraktionen werden anschließend mit einer geeigneten Analytik untersucht. Dieses Vorgehen ist mit mehreren Problemen behaftet. Zum einen müssen die gezogenen Fraktionen genug Probenmenge für die gewünschte Analytik enthalten. Bei miniaturisierten Versuchsaufbauten,

wie z.B. beim High Throughput Screening, bedeutet dies lange Fraktionszeiten. Da die Analyse einer Fraktion nur einen Mittelwert über das gesamte Zeitintervall dieser Fraktion liefert, geht hierbei viel Information verloren. Zudem besitzt jedes analytische Verfahren selbst einen gewissen Fehler [Fahrner 1999, Kaltenbrunner 2012, Proll 2004, Rathore 2008, Rathore 2010]. Häufig handelt es sich bei der angewandten Offlineanalytik um Gas- oder Flüssigchromatographie, so dass diese Methoden selbst das Problem überlappender Peaks aufweisen können [Gey 2008]. Der größte Nachteil ist jedoch die Gesamtdauer. Das Sammeln einer Fraktion über eine gewisse Zeitdauer, das Probenhandling und die offline Analytik selbst summieren sich in der Regel zu einer Gesamtzeit auf, die für die Prozesssteuerung ungeeignet ist.

Ein zweiter Ansatz besteht in der mathematischen Analyse des Summensignals. Dabei wird angenommen, dass der Signalverlauf jeder einzelnen Komponente einer gewissen mathematischen Funktion entspricht. Dies ist in der Regel ein Gauß- oder modifizierter Gauß-Verlauf. Eine Analyse der Peak Minima und Maxima sowie der Wende- und Sattelpunkte des Summensignals erlaubt dann die Zerlegung dieses in Einzelpeaks [Kong 2005, Vivó-Truyols 2005a, Vivó-Truyols 2005b]. Um diese mathematische Zerlegung machen zu können, müssen die einzelnen Peaks jedoch bis zu einem gewissen Grad entwickelt sein. In der Regel muss mindestens das Peakmaximum durchlaufen sein. Daher ist diese Methode erst nach dem Lauf, oder während des Laufes mit einem großen Zeitverzug durchführbar. Zudem ist die Annahme von gaußförmigen Peaks nur für analytische Trennungen haltbar. Im präparativen Maßstab sind stark deformierte Peaks die Regel [Unger 1994].

Einen Sonderfall der mathematischen Zerlegung nimmt die Prozesssimulation ein. Ein valides Modell vorausgesetzt, kann mit Echtzeitsimulation aus den gemessenen Summensignalen auf die Konzentrationsverläufe der einzelnen Komponenten geschlossen werden. Der Aufwand der Modellbildung, Parameterbestimmung und Modellvalidierung ist verhältnismäßig groß. In Kombination mit der Prozessentwicklung jedoch für präparative Trennungen effizient und lohnend [Helling 2013, Osberghaus 2012a, Osberghaus 2012b]. Für analytische Trennungen sind in der Regel der Aufwand und die Varianz der Proben zu groß.

Im Bereich der inline Detektion gehören spektroskopische Verfahren zu den meistgenutzten. Für organische Verbindungen, insbesondere große Moleküle wie Proteine, sind viele Verfahren basierend auf Spektraldatenanalysen entwickelt worden. Nennenswert im Zusammenhang mit dieser Arbeit ist beispielsweise die Anwendung von Infrarotspektroskopie im mittleren Wellenlängenbereich (Mid Infrared: MIR) für die Quantifizierung von Wirtszellenproteinen [Capito 2013], Fourier-transformierte Infrarotspektroskopie (FTIR) für präparative Protein Chromatographie [Großhans 2018], oder die Spektraldatenanalyse von ultraviolettem Licht (UV) und sichtbarem Licht (VIS) für die Bestimmung des Gehalts an Proteinen und Nukleinsäuren von Viren [Porterfield 2010]. Letztere ist speziell für die Konzentrationsbestimmung von Proteinen in Vielstoffgemischen interessant [Dismer 2013, Hansen 2011, Hansen 2013].

Eine Möglichkeit, Konzentrationen aus UV/VIS Spektren zu bestimmen, ist die Erstellung eines statistischen Modells. Hierfür eignet sich die Partial Least Squares (PLS) Regression (Beschreibung des Algorithmus, siehe: [Andersson 2009, Jong 1993, Wold 2001]). Dies wurde erfolgreich von Brestrich et al. durchgeführt [Brestrich 2014, Brestrich 2015, Brestrich 2016, Brestrich 2018, Dismer 2013, Rakel 2013, Rüdts 2017].

Wie eingangs erwähnt, enthält das ICM Tool unterschiedliche Varianten von Spektraldatenanalyse Methoden. Diese werden im folgenden Kapitel beschrieben. Die zweite Methode findet sich in ähnlicher Form auch bei Brestrich et al. [Brestrich 2014].

5.1.2 Spektraldaten basierte inline Konzentrationsmessung

Das ICM Tool bietet mehrere Varianten zur Konzentrationsmessung. In dieser Arbeit werden nur die beiden am weitesten entwickelten vorgestellt und verwendet. Die erste Methode basiert auf einem Satz linearer Gleichungen, welche dem Lambert-Beer'schen Gesetz entsprechen. Das überbestimmte Gleichungssystem wird dabei mit Hilfe des non-negative least Squares (NNLS) [Bro 1997, Lawson 1995] Algorithmus gelöst. Diese Variante zeichnet sich durch eine einfache Kalibrierung aus. Im Idealfall muss für jede beteiligte Komponente nur ein UV/VIS Spektrum bei bekannter Konzentration aufgenommen werden. Die Methode eignet sich für hinreichend

unterschiedliche Komponenten, versagt jedoch, wenn sich die Spektren zu sehr ähneln.

Für diesen Fall kann mittels des SIMPLS Algorithmus [Jong 1993] ein statistisches Modell erzeugt werden. Dieses Modell muss jedoch aufwendig über Trainingsdatensätze kalibriert werden.

5.1.2.1 Lösung des Lambert-Beer Gleichungssystem mittels non-negative least squares Algorithmus

Die Extinktion $E_{\lambda,i}$ eines Stoffes, also die Abschwächung des ihn durchstrahlenden Lichtes der Wellenlänge λ , folgt bei hinreichend verdünnten Lösungen dem Lambert-Beer'schen Gesetz [Otto 2011, Wedler 1985]:

$$\lg\left(\frac{I_{0,\lambda}}{I_{t,\lambda}}\right) = E_{\lambda,i} = \varepsilon_{\lambda,i} \cdot c_i \cdot d \quad (62)$$

Dabei ist $I_{0,\lambda}$ die Referenz Lichtintensität vor bzw. ohne Probe. $I_{t,\lambda}$ ist die Intensität nach Durchstrahlung der Probe. c_i ist die Konzentration der Komponente. Die Dicke d der Küvette bzw. der Messzelle entspricht der Weglänge der Lichtabschwächung. $\varepsilon_{\lambda,i}$ ist der Extinktionskoeffizient der Komponente. Dieser ist abhängig von der Wellenlänge des einfallenden Lichts. Wird die Extinktion über einen Wellenlängenbereich gemessen, so erhält man das Extinktionsspektrum (vgl. Abbildung 55). Dieses ist für die meisten UV/VIS aktiven Komponenten einzigartig. Ist mehr als eine Komponente vorhanden, so lässt sich Formel (62) für jede Komponente aufstellen und aufsummieren [Atkins 2012, Sawyer 1984]:

$$E_{\lambda} = \sum_{i=1}^n \varepsilon_{\lambda,i} \cdot c_i \cdot d \quad (63)$$

Dieser Sachverhalt ist in Abbildung 55 schematisch dargestellt.

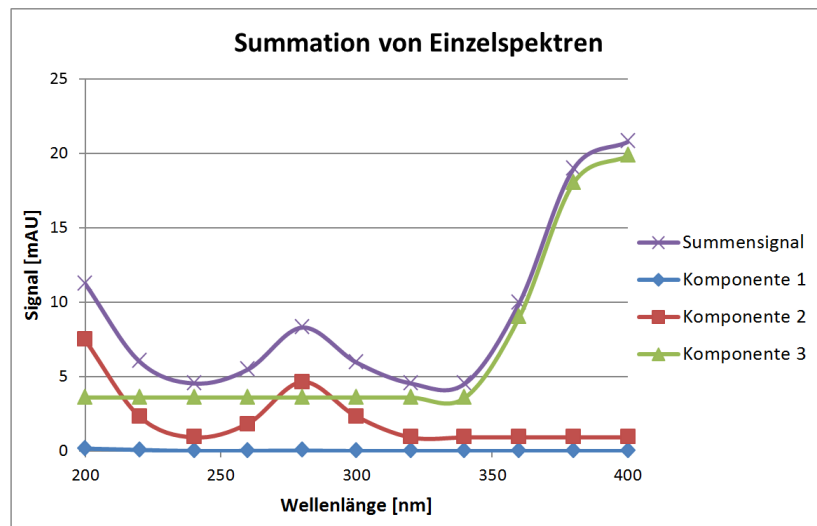


Abbildung 55: Exemplarische Darstellung der Summation dreier Einzelspektren (rote, grüne und blaue Linien) zum Summenspektrum (violette Linie).

In Abbildung 55 ist exemplarisch gezeigt, wie sich Einzelspektren (grün, rot und blau) zum Summenspektrum (violett) addieren. Dieses Summenspektrum wird letztlich vom Dioden Array Detektor (DAD) gemessen. Es lässt sich dabei für jede Diode die Gleichung (63) aufstellen. Die Anzahl von Dioden in einem Dioden Array Detektor liegt typischerweise bei 256 bis 1024. Die Anzahl an Komponenten im Gemisch liegt im Normalfall weit darunter. Es ergibt sich also ein überbestimmtes, lineares Gleichungssystem. Bekannte Extinktionskoeffizienten $\varepsilon_{\lambda,i}$ der einzelnen Stoffe vorausgesetzt, sind deren Konzentrationen die einzig unbekannten Größen. Die Lösung dieses Gleichungssystems stellt ein mathematisches Problem dar, dass auf vielfältige Weise gelöst werden kann. Da das Auftreten von negativen Konzentrationen physikalisch unmöglich ist, sind Lösungsverfahren zu bevorzugen, die keine negativen Zahlen vorsehen. Die ist beispielsweise beim non-negative least squares Algorithmus (NNLS) der Fall [Bro 1997, Lawson 1995].

Die Erfolgsaussichten dieses Ansatzes hängen maßgeblich von der Bestimmung der Extinktionskoeffizienten, genauer des UV/VIS Spektrums, der einzelnen Komponenten ab. Dafür wird eine Probe bekannter Konzentration c_i in die Flusszelle des Detektors injiziert und Gleichung (63) nach den Extinktionskoeffizienten gelöst.

Theoretisch betrachtet handelt es sich hierbei um unveränderliche Größen. Sie könnten daher auch aus Stoffdatenbanken oder von Messungen an anderen Messapparaturen bezogen werden. Dies hat sich im Verlauf der

Entwicklung am Institut nicht als sinnvoll erwiesen. Zum einen beinhaltet Gleichung (63) alle Komponenten im Strahlengang des Dioden Array Detektors. Dies schließt das Laufmedium der Chromatographie genauso mit ein wie die Durchflusszelle oder eine eventuelle Verunreinigung dieser. Diese Faktoren sind in der Regel unbekannt und erhöhen den Messfehler. Zum anderen ist die Sensitivität des Detektors von Bedeutung. Liegt die Extinktion einer Komponente bei einer bestimmten Konzentration unterhalb des Schwellenwerts, wird diese nicht erfasst. Der Extinktionskoeffizient wäre in diesem Fall null. Steigt die Konzentration so weit, dass der Schwellenwert überschritten wird, ist der Koeffizient folgerichtig jedoch ungleich null. Anders ausgedrückt: Auf Grund unzureichender Detektorsensitivität können bei steigenden Konzentrationen für einige Wellenlängen Ausschläge im UV/VIS Spektrum entstehen, die bei geringen Konzentrationen nicht zu detektieren sind. Die Extinktion der anderen Wellenlängen entwickeln sich hingegen proportional zur Konzentration.

Daher ist es empfehlenswert, die Extinktionskoeffizienten direkt mit dem für die eigentliche Messung vorgesehenen Detektor zu bestimmen. Zur Minimierung von Fremdeinflüssen hat sich folgendes Vorgehen bewährt:

Die Kalibrierung der Messung erfolgt kurz vor den eigentlichen Chromatographieversuchen. Dabei werden für jede in der Probe vorhandene Komponente Einzelproben mit Reinstoffen angesetzt. Die Konzentration richtet sich dabei an der maximal zu erwartenden Konzentration im Versuchslauf. Diese Proben werden einzeln auf die Säule injiziert und mit der für das Gemisch vorgesehenen Methode gefahren. Dadurch werden sämtliche Einflüsse des Puffers und eventueller Leachables direkt mitgemessen. Der Einzelpeak kann dann entsprechend analysiert werden. Für einen Einzelpeak bekannter Injektionsmasse ist für jeden Punkt im Chromatogramm die Konzentration bekannt. Im Normalfall reicht die Bestimmung der Extinktionskoeffizienten an einem Punkt, ergo für eine Konzentration. Der Vergleich der Spektren für unterschiedliche Konzentrationen (an unterschiedlichen Peakhöhen) zeigt, ob die Detektorsensitivität problematisch ist. Entstehen bei höheren Konzentrationen Ausschläge im Spektrum, die für niedrige nicht vorhanden sind, sollten die Extinktionskoeffizienten für mehrere Konzentrationen am selben Peak bestimmt werden. Für die ICM Messungen werden die Extinktionskoeffizienten dann nicht mehr als feste Faktoren,

sondern als Funktionen der Konzentration z.B. mittels Polynom oder Spline-Interpolation verwendet.

Das Lambert-Beer'sche Gesetz gilt nur für verdünnte Lösungen [Atkins 2012]. Diese Annahme ist für die meisten Proteingemische hinreichend erfüllt. Falls dies nicht mehr der Fall ist, oder die Spektren der einzelnen Komponenten zu ähnlich sind, sollte die Verwendung eines statistischen Modells erwogen werden.

5.1.2.2 *Statistisches Model mit SIMPLS Algorithmus*

Die Verwendung eines statistischen Modells verfolgt einen etwas anderen Ansatz, als die Lösung des linearen Gleichungssystems. Der hier verwendete PLS Algorithmus reduziert die gemessenen Extinktionsdaten (X) aus mehreren Trainingsmessungen bekannter Konzentration zu einem Satz von Latenten Variablen (LV). Bei zukünftigen Messungen lassen sich dann die Konzentrationen (Y) der Komponenten mit Hilfe der Latenten Variablen aus den beobachteten Daten, also den Extinktionswerten, berechnen. Ausführliche Beschreibungen zum PLS Algorithmus und dem hier verwendeten SIMPLS finden sich hier: [Andersson 2009, Jong 1993, Wold 1982, Wold 2001].

Zum Erzeugen der Latenten Variablen ist stets ein Trainingsdatensatz notwendig. Dafür müssen Mehrstoffgemische aller beteiligten Komponenten mit unterschiedlichen Konzentrationen und unterschiedlichen Zusammensetzungen erzeugt und gemessen werden. Die Anzahl an benötigten Versuchen steigt damit mit der Anzahl an Komponenten im Gemisch stark an. Dies erhöht den experimentellen Aufwand gegenüber der Verwendung des linearen Gleichungssystems, wo für jede Komponente eine Reinstoffmessung genügt.

Die im vorhergehenden Kapitel 5.1.2.1 beschriebene Methode beruht auf fixen Stoffdaten. Unter Berücksichtigung der dort genannten hardwareseitigen Einschränkungen ist die Methode theoretisch universell einsetzbar, egal welche Konzentration zur Bestimmung der Extinktionskoeffizienten verwendet wurde. Dies ist für das statistische Modell nicht zwingend gegeben. Häufig beschränkt sich die Anwendbarkeit auf den Konzentrations- und Mischungsverhältnissbereich innerhalb des Trainingssets.

Auf Grund der Verwendung unterschiedlicher Konzentrationen im Trainingsset ist die Detektorsensitivität jedoch bereits in den Latenten Variablen enthalten, so dass dieses Problem hier nicht berücksichtigt werden muss.

Derzeit existieren unterschiedliche Varianten des PLS Algorithmus [Andersson 2009]. In dieser Arbeit wird die SIMPLS Variante verwendet [Jong 1993]. Diese ist im Vergleich zum weit verbreiteten NIPALS schneller [Andersson 2009, Jong 1993]. Es wird angestrebt, die Konzentrationsberechnungen in kürzeren Zeitabständen als die 10 Hz Messrate des Dioden Array Detektors durchzuführen. Andernfalls müsste die Messrate verringert und damit die Zeitauflösung der Messungen verschlechtert werden.

Eine ausführliche Beschreibung eines ähnlichen Ansatzes für ein Protein Gemisch ist auch hier beschrieben: [Brestrich 2014].

5.2 Material und Methoden

5.2.1 Elutionsmittel, Testsubstanzen und Chromatographie-Säulen

Alle Experimente mit Proteinen wurden mit wässrigen Puffern durchgeführt. Für die Ionenaustausch Chromatographie wurde 20 mM NaPi Puffer bei einem pH-Wert von 6,0 als Beladungspuffer A verwendet. Der Elutionspuffer B enthielt zusätzlich 1 M NaCl. Für die analytische Größenausschluss Chromatographie (SEC) wurde ein 100 mM NaPi Puffer mit 100 mM Natriumsulfat bei einem pH Wert von 6,6 benutzt. Alle Salze stammen von der Firma Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland).

Für das erste Anwendungsbeispiel wurden Chymotrypsinogen-A, Lysozym (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland) und Cytochrom-C (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Als Säule wurde eine vorgepackte Fractogel[®] EMD SO3 (M) Säule benutzt (5-50, 1 ml, Atoll GmbH, Weingarten, Deutschland). Das IgG für das zweite Fallbeispiel entstammte aus der eignen Fermentationslinie [Gronemeyer 2017].

5.2.2 Anlagen und Apparate

Mit Ausnahme der SMB Versuche erfolgten alle Messungen an einem VWR-Hitachi LaChrom Elite[®] HPLC System. Dieses besteht aus einer quaternären Gradientenpumpe L-2130, einem Autosampler L-2200 und einem L-2455 Dioden Array Detector. Dieser wurde nicht für die ICM Messungen verwendet, sondern diente als Referenzinstrument.

Die ICM Messungen wurden an einem Smartline DAD 2600 mit einer 10 mm, 10 μ L Durchflusszelle der Firma Knauer Wissenschaftliche Geräte GmbH (Berlin, Deutschland) durchgeführt. Hinter diesem war zudem ein Foxy Jr. Fraktionssammler (Teledyn Isco, Lincoln, NE, USA) verbaut.

5.2.3 Inline Concentrations Measurement

Die ICM Messungen basieren auf UV/VIS Spektralmessungen. Diese wurden mit dem Smartline DAD 2600 durchgeführt. Dieser verfügt über 256 Dioden. Der gemessene Wellenlängenbereich kann zwischen 190 und 510 nm eingestellt werden. Die Bandbreite ist zwischen 4 und 25 nm einstellbar. Die maximale Messrate beträgt 10 Hz, also 100 ms [Knauer 2007].

Ein Ziel der ICM Messungen ist die Prozessautomatisierung von Chromatographischen Prozessen durch die inline Bestimmung der Ausgangskonzentrationen der Chromatographiesäule. Dafür ist eine möglichst geringe Reaktions- und Messzeit anzustreben. Der Richtwert ist die Messrate des Detektors. Die Datenverarbeitung des aktuellen Messwerts sollte abgeschlossen sein, bevor der DAD den nächsten Messpunkt gemessen hat. Für die durchzuführenden Berechnungen stellen aktuelle Prozessoren ausreichend Rechenleistung zur Verfügung. Als geschwindigkeitslimitierender Schritt wird daher eher die Kommunikation zwischen einzelnen Programmen betrachtet. Aus diesem Grund wurden möglichst viele Aufgaben in einem Programm vereint.

Als Programmiersprache wurde die objektorientierte und klassenbasierte Sprache Java gewählt. Programme dieser Sprache werden in der Java Virtual Machine (JVM) ausgeführt, welche für alle gängigen Plattformen und Architekturen erhältlich ist. Dies erlaubt es, eine einmal geschriebene Anwendung ohne Aufwand auf unterschiedlichen Systemen auszuführen [Gosling 2013].

Ein Programmbaustein übernimmt die Kommunikation zwischen Computer und Detektor. Diese sind über eine serielle EIA RS-232 Schnittstelle miteinander verbunden. Als Computer wurde ein Laborcomputer vom Typ Dell OptiPlex 5040 SFF mit Intel Core i5-6600 Prozessor und 8 GB Arbeitsspeicher verwendet (Dell Technologies, Round Rock, Tx, USA). Auf diesem war Windows 7 Professional (64 Bit, Microsoft, Redmond, WA, USA) installiert.

Als weitere Bausteine sind die Visualisierung und Abspeicherung der Daten in „Comma Separated Value (CSV)“ Dateien sowie die eigentlichen Berechnungsmethoden enthalten. Damit übernimmt das Programm alle für die ICM benötigten Aufgaben.

Die Berechnungsmethoden selbst unterscheiden sich in Lösung des linearen Gleichungssystems oder Erzeugung des statistischen Modells. Für erstgenannten Ansatz ist, neben anderen, der Non-Negative Least Squares Algorithmus [Bro 1997, Lawson 1995] implementiert. Für die statistische Modellierung wird der SIMPLS Algorithmus [Jong 1993] verwendet.

5.2.4 Analytische Trennung eines Protein Testgemischs mittels Kationen Austausch Chromatographie mit NNLS- Algorithmus

Die Testtrennung der drei Proteine (Chymotrypsinogen-A, Cytochrom-C und Lysozym) wurde auf einer vorgepackten Fractogel[®] EMD SO₃⁻ Säule durchgeführt. Die Säule wurde vor jedem Lauf mit Puffer A equilibriert. Die Chromatographiemethode begann mit der Injektion der Probe. Zeitgleich startete der 10 Kolonnenvolumen (CV) Gradient von 100 vol.-% Puffer A auf 100 vol.-% Puffer B. Es folgten 5 CV Regenerierung und 5 CV Re-Equilibrierung. Der Volumenstrom betrug 1 ml/min. Wie beabsichtigt wurde mit dem 10 CV Gradienten keine Basislinientrennung erreicht.

Vor dem Versuchslauf wurden die Extinktionskoeffizienten $\varepsilon_{\lambda,i}$ der einzelnen Stoffe bestimmt. Dazu wurden Reinstoffproben jedes Proteins angesetzt. Hierzu wurden jeweils 10 mg Protein in 1 ml Puffer A gelöst. 20 μ l dieser Proben wurden auf die Säule injiziert und die angegebene Chromatographiemethode gestartet. Das erhaltene Chromatogramm wurde nach dem Lauf wie folgt ausgewertet:

Zunächst wurde das Extinktionssignal E_{λ} über einen Faktor F in einen Konzentrationsverlauf umgerechnet. Es gilt dabei zu jedem Zeitpunkt:

$$c_i(t) = F \cdot E_{\lambda}(t) \quad (64)$$

Das Integral des Konzentrationsverlaufs über die Zeit multipliziert mit dem Volumenstrom ergibt die Masse an Protein, welche die Säule verlässt. Diese muss der injizierten Masse $m_{i,inj}$ entsprechen:

$$m_{i,inj} = \dot{V} \cdot \int_0^t c_i(t) dt \quad (65)$$

Einsetzen von Gleichung (64) in Gleichung (65) und Umstellen nach F ergibt den benötigten Umrechnungsfaktor:

$$F = \frac{m_{i,inj}}{\dot{V} \cdot \int_0^t E_\lambda(t) dt} \quad (66)$$

Nach der Umrechnung des Extinktionsverlaufs in einen Konzentrationsverlauf für das gesamte gemessene Spektrum wurden die Extinktionskoeffizienten bestimmt. Dafür wurde für einen Punkt im Chromatogramm Gleichung (62) nach den Koeffizienten gelöst. In diesem Beispiel wurde dafür jeweils ein Punkt im abfallenden Ast des Chromatogramms gewählt, der einer Konzentration von 0,01 g/l entsprach. Ein Vergleich von Formel (62) und Formel (64) zeigt, dass die Extinktionskoeffizienten bei bekannter Schichtdicke d auch direkt aus dem Umrechnungsfaktor F bestimmt werden könnten. Dies ist jedoch nur für Wellenlängen möglich, wo auch ein nennenswerter Peak entsteht.

Die Bestimmung der Extinktionskoeffizienten mit der für die Trennung vorgesehenen Methode umgeht die in Kapitel 5.1.2.1 genannten Probleme.

Nach der Bestimmung der Koeffizienten wurde die eigentliche Messung durchgeführt. Dazu wurde zunächst die Mehrstoffprobe aus den Reinstoffproben erzeugt. Hierzu wurden jeweils 0,5 ml der Einzelproben in einem Vial zusammengefügt. Von dieser Probe wurden 60 µl auf die Säule injiziert. Die injizierte Masse jedes einzelnen Proteins im Gemisch entsprach daher genau der injizierten Masse in den Einzelstoff-Versuchen.

Die Messung wurde über drei Ansätze ausgewertet:

1. Über die ICM Messung. Das Tool bestimmte inline aus den gemessenen Spektren die Einzelkonzentrationen der Komponenten. Diese Konzentrationsverläufe wurden gemäß Gleichung (65) integriert. Die so gemessene Masse wurde mit der injizierten Masse verglichen. Die Abweichung dieser Massen wurde prozentual bestimmt.
2. Über offline Peakflächenbestimmung. Hierzu wurden mit den verbliebenen Reinstoffproben Verdünnungsreihen erstellt. Dazu wurden die Proben im Volumenverhältnis 1:1 mit Puffer A gemischt, 20 µl

injiziert und der Chromatographielauf gestartet. Danach wieder verdünnt und erneut gemessen. Dies wurde zehnmal wiederholt. Aus den gemessenen Peakflächen wurde für jedes Protein eine Kalibrierungskurve erstellt. Ausgewertet wurde nur das Chromatogramm für 280 nm Wellenlänge. Für das Dreistoffgemisch wurden die Peakflächen, wie in der offline Analytik üblich, von der Basislinie bis zum ersten Minimum für Chymotrypsinogen-A, vom ersten zum zweiten Minimum für Cytochrom-C und vom zweiten Minimum bis zur Basislinie für Lysozym bestimmt.

3. Über mathematische Peakentfaltung mit der Annahme von gaußförmigen bzw. modifiziert gaußförmigen Peaks. Hierzu wurde das Chromatogramm in Origin (OriginLab, Northampton, MA, USA) geladen und die Peakverläufe mit den in Origin vorhandenen Peakfit Methoden an gaußförmigen bzw. modifiziert gaußförmigen Verlauf angepasst. Die so erhaltenen Peaks wurden integriert und die ermittelte Fläche mit der Kalibrierungskurve aus 2. Verglichen.

5.2.5 Immunoglobulin G (IgG) Monomer und Dimer Bestimmung mit SIMPLS-Algorithmus

Das IgG für diese Messungen stammte aus eigener Fed-Batch Zellkultivierung. Diese wurde bei 3000 xg zentrifugiert und anschließend filtriert (0,20 µm Spritzenfilter, VWR International, Radnor, PA, USA). Die Probe wurde anschließend mit der in Kapitel 3.3.3.1 beschriebenen Protein A Chromatographie aufgereinigt. Um das Monomer vom Dimer zu trennen, wurde die in Kapitel 3.3.3.2 beschriebene Größenausschluss Chromatographie verwendet. Der erste SEC Lauf wurde nicht fraktioniert sondern diente der Identifizierung der Fraktionierungszeiten. Dimer und Monomer Peak wurden in separate Vials fraktioniert. Um die Verdünnung zu minimieren und die Reinheit zu erhöhen, wurde von jedem Peak nur der Bereich ab 50 % maximaler Peakhöhe fraktioniert. Mit den so gewonnenen Proben wurden die Trainings- und Validierungsdatensätze erstellt. Hierfür wurden elf Mischungen unterschiedlicher volumetrischer Mischungsverhältnisse erzeugt. Diese begannen bei 0 vol.-% Monomer und 100 vol.-% Dimer und gingen in 10 vol.-% Abstufungen bis 100 vol.-% Monomer und 0 vol.-% Dimer. Als Validierungsdatensätze wurden die Proben

mit 20 vol.-%, 50 vol.-% und 80 vol.-% Monomer verwendet, die restlichen neun gehörten entsprechend zum Trainingsdatensatz.

Bei dem hier verwendeten IgG findet eine Umwandlung von Monomer zu Dimer und umgekehrt statt. Aus diesem Grund wurden die Proben vor der eigentlichen Messung über Nacht bei 4°C gelagert. Anschließend wurden alle Proben mit der genannten SEC Methode auf die enthaltene IgG Monomer und Dimer Konzentration analysiert. Die 100 vol.-% Monomer Probe enthielt dabei ca. 0,5 mg/ml Monomer und 0,02 mg/ml Dimer. Die 100 vol.-% Dimer Probe ungefähr 0,2 mg/ml Monomer und 0,1 mg/ml Dimer. Es wurde kein festes Gleichgewicht zwischen der Monomer und der Dimer Konzentration festgestellt.

Der experimentelle Aufbau der ICM Messung bestand aus der bereits vorgestellten HPLC Anlage. An Stelle der Säule wurde ein geschlossener Behälter mit 2 ml Füllvolumen angeschlossen. Dieser wurde kontinuierliche mit 1 ml/min Puffer A durchströmt. An den Auslass des Tanks wurde der Detektor gefolgt vom Fraktionssammler angeschlossen. Dieser hat den kompletten Lauf in 0,5 min Abständen fraktioniert. Die so erhaltenen 0,5 ml Proben wurden mit der SEC auf den Monomer und Dimer Gehalt analysiert.

Die Injektion der Probe erfolgte, wie auch bei der Chromatographie, mit dem Autosampler in den kontinuierlichen Volumenstrom. Das Injektionsvolumen betrug 99 µl.

Diese Methode stellt ein „Worst Case“ Szenario da. Es findet keine Trennung zwischen IgG Monomer und Dimer statt. Dies entspricht zum Beispiel einer Protein A Chromatographie oder einem Steril-Filtrationsprozess. Des Weiteren könnte bei sich moderat überlappenden Peaks eine Verbesserung der Messergebnisse durch das Treffen diverser Annahmen erzielt werden. Ein Beispiel hierfür wäre die Annahme, dass nach dem Durchschreiten des Peak Maximums ein stetiger Konzentrationsabfall eintreten muss. Solche Annahmen sind hier nicht möglich.

5.3 Validierung und Anwendungsbeispiel

5.3.1 Analytische Trennung eines Protein Testgemischs mittels Kationen Austausch Chromatographie mit NNLS- Algorithmus

Dieses Beispiel orientiert sich an einem typischen analytischen Trennproblem, zeigt aber auch das Potential für präparative Trennungen auf. Die drei Proteine des Testgemischs zeigen, wie in Abbildung 56 zu sehen ist, relativ ausgeprägte Unterschiede im UV/VIS Spektrum. Dies erlaubt die Verwendung des non-negative least squares Algorithmus. Die dazu gehörige Methodik ist in Kapitel 5.2.4 beschrieben.

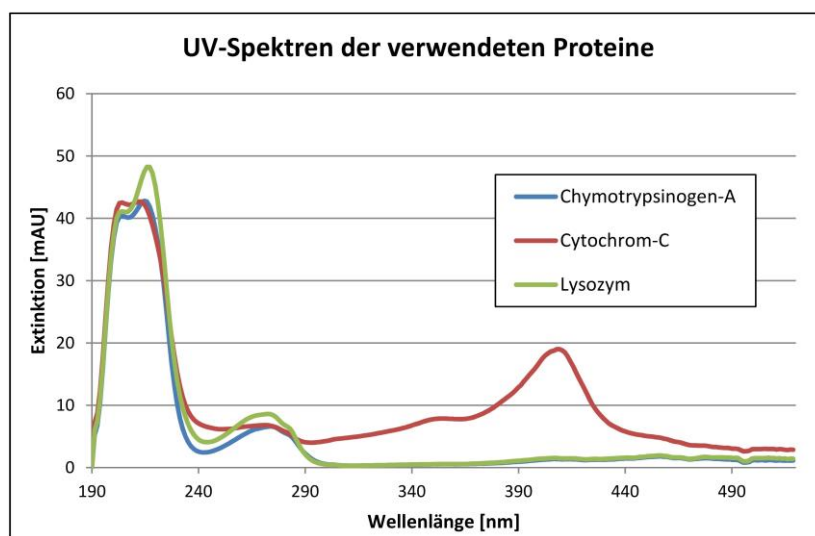


Abbildung 56: UV/VIS Spektren der Reinstoffproben von Chymotrypsinogen-A, Cytochrom-C und Lysozym bei 0,01 g/l.

Abbildung 57 zeigt das Chromatogramm der Trennung. Der Extinktionsverlauf bei einer Wellenlänge von 280 nm ist in dunkelblau dargestellt. Dies entspricht dem normalen Chromatogramm eines UV/VIS Detektors. Wie beabsichtigt erfolgte keine Basislinientrennung. Die mit der ICM Methode ermittelten Konzentrationsverläufe sind in hellblau für Chymotrypsinogen-A, rot für Cytochrom-C und grün für Lysozym abgebildet. Diese wurden zeitgleich zum Extinktionssignal gemessen. Der Zeitverzug zwischen Messung des UV/VIS Spektrums und dem Abschluss der ICM Berechnungen ist minimal. Die Probenzeit kann bei dem hier verwendeten DAD Detektor auf minimal 100 ms eingestellt werden. Die Berechnungen waren auch bei 100 ms jeweils abgeschlossen, bevor der Detektor den nächsten Datenpunkt gemessen hat. Damit war die Rechenzeit geringer als die Probenzeit. Die Rechenzeit ist

abhängig von der Anzahl an Komponenten. Für eine höhere Anzahl kann es nötig sein, die Probenzeit entsprechend zu verlängern.

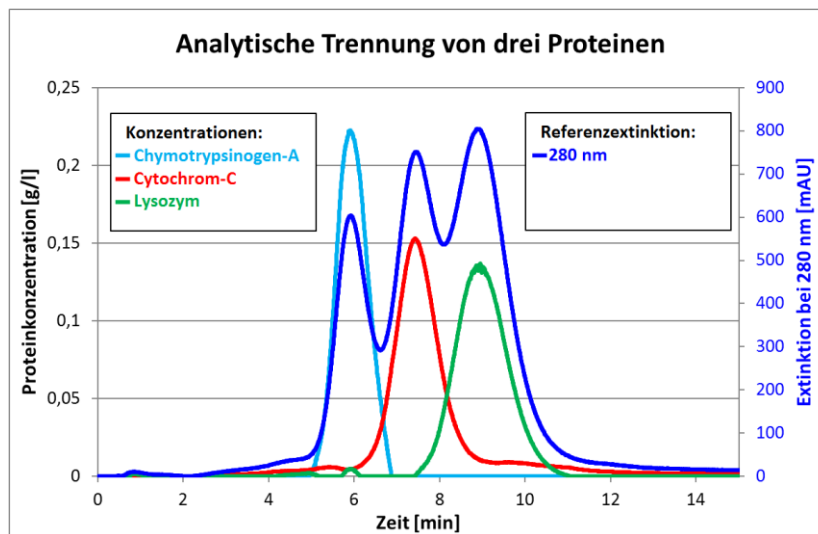


Abbildung 57: *Inline Concentration Measurement* des Dreistoffgemischs Chymotrypsinogen-A, Cytochrom-C und Lysozym auf einer Ionenaustausch-Säule unter analytischen Bedingungen.

Bei dem in Abbildung 57 dargestellten Vergleich ist zu beachten, dass die Konzentrationsverläufe nicht die Extinktionskurve treffen müssen. Dies wäre nur bei einem Extinktionskoeffizienten von eins der Fall. Zudem müssten alle Komponenten bei der gegebenen Wellenlänge den gleichen Extinktionskoeffizienten aufweisen, damit die Verhältnisse der Peakhöhen der Konzentrationsverläufe jenen des Extinktionsverlaufs entsprechen.

Ein direkter Vergleich zwischen den mit ICM gemessenen Verläufen der Konzentrationen im Dreistoff Gemisch und den Verläufen der Reinstoff Injektionen ist in Abbildung 58 abgebildet. Es ist zu sehen, dass der Chymotrypsinogen-A Peak bei der Injektion des Gemischs etwas früher eluiert. Die mittlere Verweilzeit sinkt von 6,07 auf 5,95 Minuten. Zudem ist die Desorptionsfront schärfer. Dieses Verhalten ist als Verdrängungseffekt in der Chromatographie bekannt [Seidel-Morgenstern 1995]. Der Cytochrom-C Peak hat in beiden Fällen eine sehr ähnliche Form. Es ist jedoch eine gewisse Co-Elution mit den benachbarten Komponenten zu erkennen. Die Form des Lysozym Peaks ändert sich nicht. Auch die mittlere Verweilzeit des Lysozym und des Cytochrom-C bleibt unverändert. Alle Werte sind in Tabelle 15 zusammengefasst.

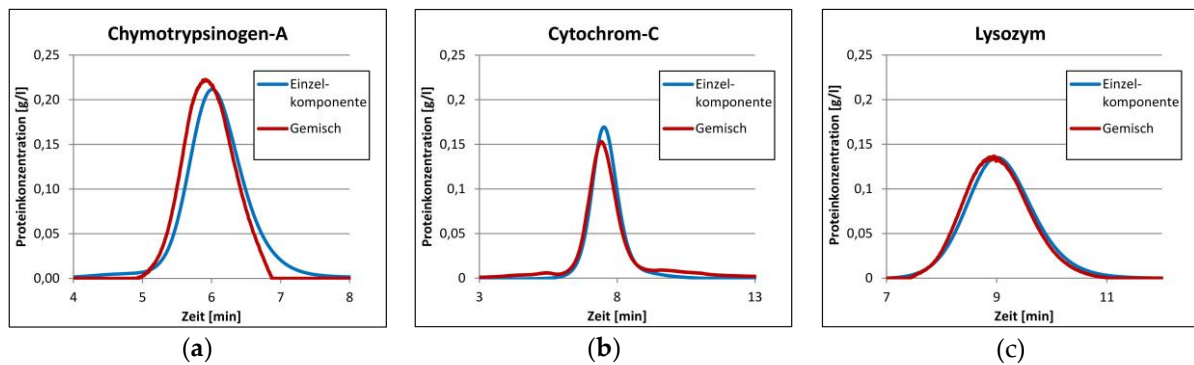


Abbildung 58: Vergleich zwischen Reinstoffinjektion (blaue) und ICM Messung des Dreistoffgemischs (rot) für (a) Chymotrypsinogen-A; (b) Cytochrom-C; (c) Lysozym

Tabelle 15: Abweichung der mittleren Verweilzeit zwischen Einzelkomponenten- und Gemisch Injektion:

Protein	Mittlere Verweilzeit	
	Reinstoff [min]	Gemisch [min]
Chymotrypsinogen-A	6,07	5,96
Cytochrom-C	7,62	7,63
Lysozym	9,03	9,01

Wie im Methodenteil beschrieben ist, stimmt die injizierte Probenmasse des Dreistoffgemischs genau mit der Masse der Einzelversuche überein. Dies ermöglicht einen einfachen Vergleich der Ergebnisse. Die ICM Messungen ermitteln die Masse der Proteine mit einer mittleren Abweichung von $0,02 \pm 0,48 \%$. Der Vergleich der Peakflächen mit der Kalibrierungskurve ergibt einen Fehler von ca. $-17 \pm 7 \%$. Die einzelnen Flächen sind dabei durch das Lot an den zwei Minima getrennt. Die Annahme von Gauß- oder modifizierten Gauß-Peaks und der Vergleich der Flächen unter diesen Kurven führen zu größeren Fehlern. Hier sind die Ergebnisse im Mittel um ca. $17,5 \pm 15,5 \%$ (Gauß) bzw. $21,3 \pm 15,5 \%$ zu groß. Die Ergebnisse für die einzelnen Komponenten sind in Tabelle 16 zusammengefasst.

Tabelle 16: Prozentuale Abweichung der gemessenen Proteinmasse von der injizierten Proteinmasse für unterschiedliche Bestimmungsmethoden:

Protein	ICM [%]	Lotfällung [%]	Gauß [%]	modifizierter Gauß [%]
Chymotrypsinogen-A	-0,63	-7,09	9,92	12,71
Cytochrom-C	0,50	-22,37	3,21	8,02
Lysozym	0,19	-21,52	39,62	43,09
Mittlere Abweichung	0,02	-16,99	17,58	21,27
Standardabweichung	0,48	7,01	15,82	15,54

Abbildung 59 zeigt den Verlauf des Gauß- bzw. modifizierten Gauß-Fits für Chymotrypsinogen-A und Lysozym. Die Verläufe für Cytochrom-C sind der Übersichtlichkeit halber nicht mit aufgeführt. Es ist zu erkennen, dass beide Fit Funktionen die Verläufe der beiden Proteine als überlappend identifizieren. Dies wird von den ICM Messungen nicht bestätigt. Über die Richtigkeit der mittels ICM gemessenen Verläufe kann mit der hier verwendeten Validierungsmethode keine Aussage getroffen werden. Dazu hätte das Chromatogramm mehrfach fraktioniert und mit geeigneter Analytik analysiert werden müssen. Bei vorangegangenen Arbeiten hat sich gezeigt, dass weniger als 0,5 ml pro Fraktion nicht sinnvoll sind. Das entspräche bei dem anliegenden Fluss einem Zeitraum von einer Minute. Bei einer Peakbreite von ca. 2 Minuten ergäbe das zwei Messwerte pro Peak. Auch darüber wäre keine belastbare Aussage möglich. Auf Grund der in Abbildung 58 und Tabelle 15 gefundenen Ähnlichkeit ist die Richtigkeit der ICM Verläufe jedoch äußerst wahrscheinlich.

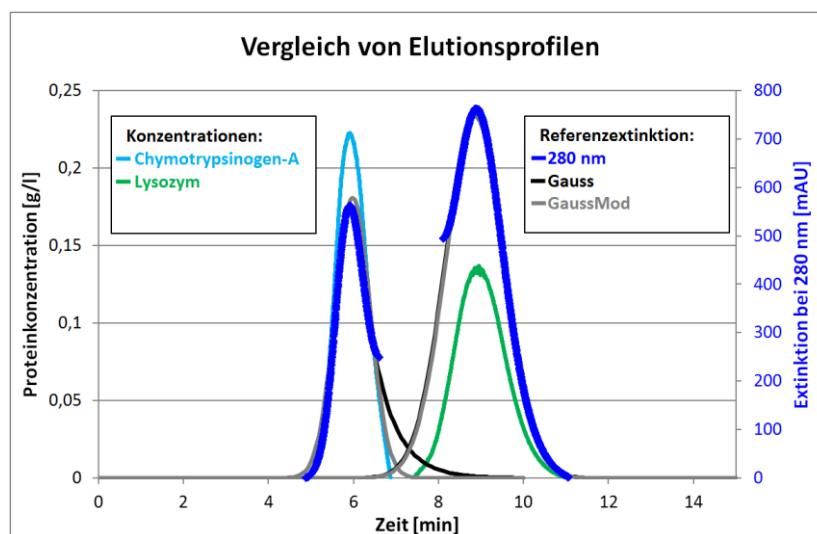


Abbildung 59: Vergleich von Elutionsprofilen. Die Verläufe in hellblau bzw. grün wurden inline mit ICM gemessen. Die Verläufe in schwarz bzw. grau wurden nach dem Lauf über Gauß-Funktionen respektive modifizierte Gauß-Funktionen an das Extinktionssignal angepasst.

Die Bestimmung der Proteinmasse mit der Inline Concentration Measurement Methode ist mit sehr geringem Fehler möglich. Die Methode ist als valide anzusehen. Die Genauigkeit der Vorhersage steigt im Vergleich zu herkömmlichen Methoden um mehr als 15%. Die Richtigkeit des ermittelten Konzentrationsverlaufs ist nicht bestätigt, allerdings wahrscheinlich. Andernfalls würde vermutlich eine größere Abweichung der Proteinmasse

ermittelt, da diese über das Integral des Konzentrationsverlaufs bestimmt wird. Weiterhin zeigen die Vergleiche in Abbildung 58 keine großen Abweichungen. Zur Bestätigung des realen Konzentrationsverlaufs hätte fraktioniert und offline analysiert werden können. Das benötigte Fraktionsvolumen läge bei 0,5 ml. Damit ergäben sich bei einem Volumenstrom von 1 ml/min und 2 min Peakbreite ca. vier Vergleichswerte pro Peak. Dies ist für eine verlässliche Aussage über die Peakform zu wenig.

Aus den gemessenen Konzentrationen lässt sich leicht auf die Reinheit schließen. Einen richtigen Verlauf angenommen, würde sich diese Methode gut eignen, um in der präparativen Chromatographie Echtzeitdaten basiert zu fraktionieren.

5.3.2 Immunoglobulin G (IgG) Monomer und Dimer Bestimmung mit SIMPLS-Algorithmus

In diesem Versuch wurden elf Mischungsverhältnisse der SEC Fraktionen des IgG Monomer und Dimer Peaks gemessen. Neun davon wurden für die Kalibrierung des SIMPLS Algorithmus verwendet. Die z-transformierten UV/VIS Spektren für die Proben mit dem höchsten und geringsten IgG Monomer Gehalt sind in Abbildung 60 (a) dargestellt. Es wurde ein statistisches Modell erzeugt, welches gleichzeitig die Monomer und Dimer Konzentration berechnet, nicht jeweils ein Modell pro Konzentration. Der Beitrag der einzelnen Wellenlängen zu diesem Modell sind im „Variable Importance on Projections“ (VIP) Plot dargestellt (Abbildung 60 (b)). Hier ist zu erkennen, dass der relevante Bereich zwischen 200 nm und 290 nm liegt. Dies wird auch durch Abbildung 61 (a) bestätigt, in dem die Verwendung der einzelnen Wellenlängen durch die einzelnen Latenten Variablen dargestellt ist. Die Ausschläge in der Region ab 390 nm könnten vom Rauschen dominiert sein.

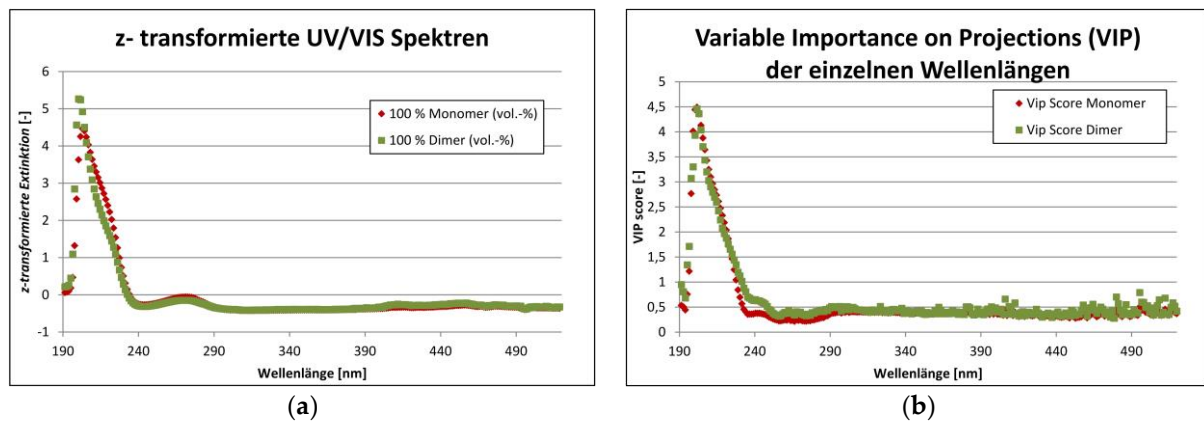


Abbildung 60: (a) z-transformierte UV/VIS Spektren der Trainings Sets mit dem höchsten und niedrigsten IgG Monomer Gehalt. Rote Punkte repräsentieren die Werte für die Mischung aus 100 vol.-% Monomer SEC Fraktion, grüne Punkte zeigen die Werte für 100 vol.-% Dimer. Da eine Umwandlung von Monomer zu Dimer und umgekehrt stattfindet, sind in beiden Proben dennoch auch die jeweils andere Komponente vorhanden. (b) Variable Importance on Projections (VIP) Werte der einzelnen Wellenlängen für die Bestimmung der Konzentration von Monomer (rot) and Dimer (grün).

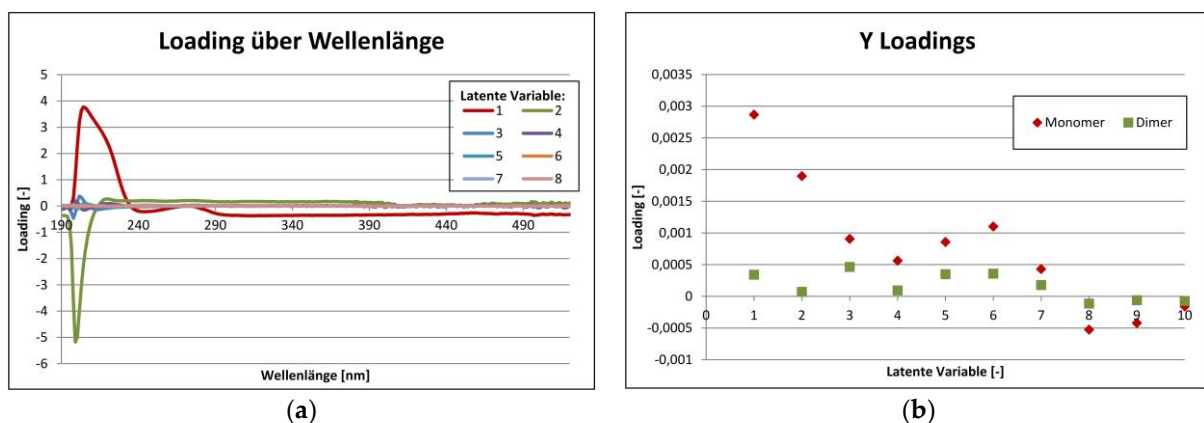


Abbildung 61: (a) Loading über Wellenlängen für die ersten acht Latenten Variablen. Je höher der Absolutwert ist, desto wichtiger ist diese Wellenlänge für die jeweilige Latente Variable; (b) Loadings der Y Resultate über die Latenten Variablen. Je höher der Absolutwert ist, desto wichtiger ist die jeweilige Latente Variable für die Berechnung der Monomer (rot) bzw. Dimer (grün) Konentration.

Es wurde ein statistisches Modell erzeugt, was sowohl die IgG Monomer als auch die Dimer Konzentration berechnet. Wie erwartet steigt der Prozentsatz der erklärten Varianz mit der Anzahl an Latenten Variablen an. Bei der Verwendung von drei Latenten Variablen liegt der Prozentsatz bei 80 %. Für sechs Latente Variablen werden bereits 93% erreicht. Ab acht Latenten Variablen werden 98% erreicht. Die Relevanz der einzelnen Latenten Variablen für die Konzentrationsberechnung des Monomers oder Dimers ist

Abbildung 61 (b) zu entnehmen. Ab acht Latenten Variablen steigt die erklärte Varianz nur noch sehr gering an. Daher wurde für die folgenden Berechnungen ein Modell mit acht Latenten Variablen benutzt. Der mittlere Kalibrationsfehler (engl. root mean square error of calibration (RMSEC)) liegt dann bei 0,14 mg/l für IgG Monomer und 0,025 mg/l für IgG Dimer.

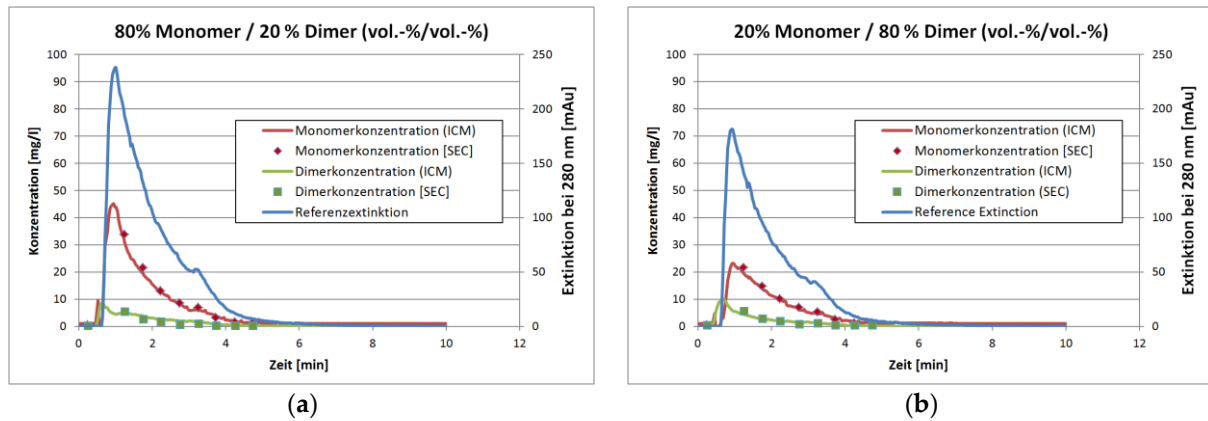


Abbildung 62: Konzentrationsmessungen über die Zeit von IgG Monomer und Dimer nach der Injektion in einen kontinuierlich durchströmten Rührkessel: (a) für ein volumetrisches Mischungsverhältnis der SEC Fraktionen von 80 % Monomer und 20 % Dimer, (b) für ein volumetrisches Mischungsverhältnis von 20 % Monomer und 80 % Dimer.

Abbildung 62 zeigt die Extinktions- und Konzentrationsverläufe für zwei der drei Validierungsdatensätze. In blau ist jeweils die Extinktion bei 280 nm aufgetragen. In rot bzw. grün die Konzentration des IgG Monomers respektive Dimers. Die durchgezogenen Linien stellen dabei die ICM Messungen dar, die Quadrate sind die Messpunkte der SEC Fraktionen. Diese sind jeweils in der Mitte des Fraktionsintervalls aufgetragen.

Wie zu sehen ist, stimmen die ICM Verläufe gut mit den SEC Verläufen überein. Die direkte Gegenüberstellung für die gesamten Validierungsmessungen ist in Abbildung 63 zu sehen. Das Bestimmtheitsmaß R^2 liegt jeweils bei 0,98. Der mittlere Vorhersagefehler (engl. root mean square error of prediction (RMSEP)) beträgt 0,13 mg/l für IgG Monomer und 0,019 ml/l für IgG Dimer.

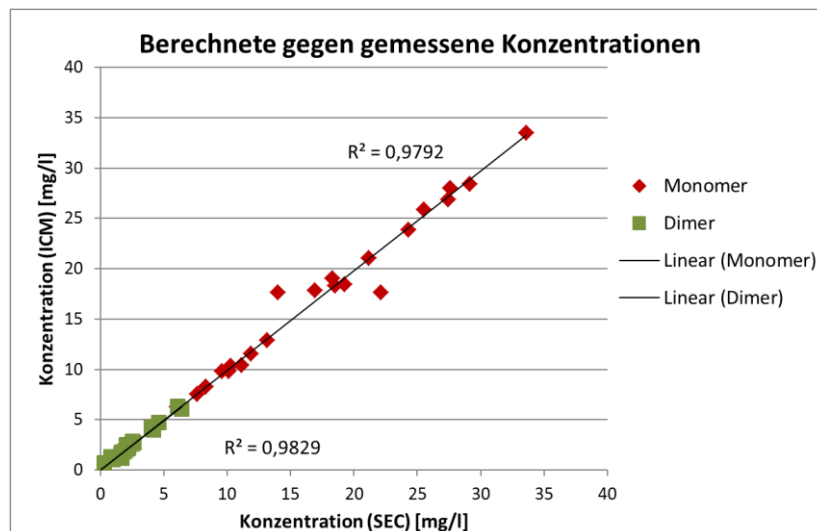


Abbildung 63: Vergleich zwischen mittels Fraktionierung und SEC Chromatographie gemessenen und mit Inline Concentration Measurement gemessenen Konzentrationen.

Da der SIMPLS Algorithmus ein statistisches Modell erstellt, bestünde die Möglichkeit, dass dieses lediglich den Verteilungskoeffizienten zwischen Monomer und Dimer vorhersagt, sowie die Konzentration von einem der beiden korrekt bestimmt. Dies wäre für Prozesse, in denen keine Trennung zwischen IgG Monomer und Dimer stattfindet unproblematisch. Dies könnte beispielsweise ein Filtrationsschritt sein. Auf Grundoperationen angewendet, bei denen eine Trennung stattfindet, wären die Ergebnisse jedoch falsch. Der Vergleich zwischen Abbildung 62 (a) und (b) zeigt jedoch, dass kein fester Verteilungskoeffizient ermittelt wurde. Das Extinktionsmaximum für den 20 vol.-% Monomer Versuch ist ca. 25 % geringer als für den Versuch mit 80 vol.-% Monomer. Die dazugehörige Monomer-Konzentration ist jedoch um 50 % geringer bei 15 % höherer Dimer-Konzentration. Dies entspricht einer anderen Konzentrationsverteilung.

Dass in der Probe, welche zu 80 vol.-% aus der Dimer SEC Fraktion besteht, mehr Monomer als Dimer vorhanden ist, liegt an der bereits erwähnten Umwandlung von IgG Monomer in Dimer und umgekehrt. Die volumetrischen Mischungsverhältnisse spiegeln daher nicht direkt das Verhältnis der Monomer und Dimer Konzentrationen wider.

Die hier durchgeführten Messungen eignen sich sowohl zur Prozesssteuerung, als auch zur Qualitätsüberwachung. Aus den IgG Monomer und Dimer Konzentrationen kann die Reinheit bestimmt werden. Vergleicht man die mittels SEC bestimmten Reinheiten mit den über ICM bestimmten, so

liegt die Abweichung im Mittel bei 0,15 %. Innerhalb der 24 Datenpunkte aus Abbildung 63 schwankt die Abweichung zwischen 0,01 % und 6 %.

5.4 Zusammenfassung und Ausblick

In diesem Kapitel wurden zwei Methoden zur inline Quantifizierung der Protein Konzentration basierend auf UV/VIS Spektraldaten vorgestellt [Zobel-Roos 2017].

Die erste Methode basierend auf dem Lambert-Beer'schen Gesetz zeichnet sich durch einfache Kalibrierung aus. Sie hat jedoch Schwächen, wenn sich die Spektren der beteiligten Komponenten sehr ähneln. Für die Trennung von drei Proteinen auf einer Ionenaustausch Chromatographie konnte eine mittlere Genauigkeit der Messung von 99,98 % festgestellt werden. Bekannte Verfahren lieferten für denselben Versuch Abweichungen von $16.99\% \pm 7.01\%$ bis $21.27\% \pm 15.54\%$.

Die zweite Methode basiert auf einem mittels SIMPLS-Algorithmus erstellten statistischen Modell. Dieses muss aufwändiger kalibriert werden, kann dann jedoch geringe Unterschiede der Spektren identifizieren. Dies wurde an unterschiedlichen IgG Monomer/Dimer Gemischen getestet. Es wurde ein Bestimmtheitsmaß von 0,98 sowie ein „root mean square error of prediction“ (RMSEP) von 0,13 mg/l für IgG Monomer und 0,019 mg/l für IgG Dimer gefunden.

Beide Methoden eignen sich, um die Konzentrationsverläufe in der Chromatographie inline zu bestimmen. Mit weniger als 100 ms Berechnungszeit ist die Methode hinreichend schnell um Prozessautomatisierung mit datenbasierter Entscheidungsfindung zu implementieren. Damit könnte bei definierter Reinheit fraktioniert oder kontinuierliche Chromatographieläufe geregelt werden. Weiterhin ist eine Anwendbarkeit zur inline Qualitätsbetrachtung von Filtrations- oder Flüssig-Flüssig Extraktions-Schritten gegeben.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Das Ziel dieser Arbeit war die Evaluierung neuer, kontinuierlicher Chromatographieprozesse für den Einsatz bei der Aufreinigung biopharmazeutischer Produkte. Als typischer Vertreter dieser Gruppe wurde Immunglobulin G als Testsubstanz gewählt. Es sollten Prozesse basierend auf klassischer, partikulärer Chromatographie als auch membrangestützte Anwendungen untersucht werden.

Für partikuläre Chromatographie wurde, ausgehend von der klassischen SMB, ein neues Verfahrenskonzept entwickelt. Dazu wurde zunächst eine Einsäulen SMB Analogie entworfen. Darauf aufbauend, und zur Ermöglichung von Gradiententrennungen, wurde die Einsäulen SMB zur integrated Counter Current Chromatographie weiterentwickelt. Diese kombiniert zwei Säulen mit unterschiedlichen Adsorbentien. Es werden stationäre Phasen verwendet, die mit gleichem Eluentensystem arbeiten. Der Gradient läuft dabei jedoch in entgegengesetzter Richtung. Dies ist zum Beispiel bei der Ionenaustausch- und der Hydrophoben Interaktionschromatographie der Fall.

Auf Grund der großen Anzahl an Prozessmöglichkeiten und dem geringen Feed Bedarf wurde zur ersten Evaluierung ein modellbasierter Ansatz gewählt. Für die partikuläre Chromatographie wurde das bekannte General Rate Model implementiert und parametrisiert. Die Isothermen vom Typ competitive Langmuir wurden über Schüttelversuche bestimmt. Auftretende Probleme mit Produktdegeneration konnten über die Verwendung von Vergleichsproben minimiert werden. Die Modellvalidierung erfolgte getrennt in Fluidodynamik und Stofftransport inkl. Gleichgewicht. Für die Fluidodynamik wurde eine mittlere Abweichung der Verweilzeit zwischen Validierungsversuchen und Simulationen von weniger als 1 % festgestellt. Die Abweichung des gesamten Modells inkl. Stofftransport und Gleichgewicht beträgt ca. 3 %. Damit ist das Modell für die vorgesehene Anwendung hinreichend genau.

Für die hier verwendeten Membranchromatographiemodule waren die bestehenden Modelle unzureichend. Es wurde daher ein neuer fluiddynamischer Ansatz gewählt. Die Validierung zeigte eine Abweichung bezogen auf die Fluidodynamik von weniger als 1 % bei insgesamt ca. 2,5 % Ungenauigkeit. Allerdings zeigten sich hier deutliche Ausreißer. Auf Grund des geringen Fehlers ist das Modell für die Prozessevaluierung verwendbar. Zur

Prozessauslegung sollte die Fluidodynamik weiter untersucht werden. Zudem legen die Ergebnisse nahe, dass das Moduldesign noch deutlich optimiert werden kann.

Für die Einsäulen SMB wurde ein vereinfachtes Modell der Normalphasen Chromatographie verwendet. Dieses wurde mit einer Abweichung von weniger als 1 % validiert.

Die Prozessbetrachtung der Einsäulen SMB begann mit der Auslegung eines klassischen SMB Prozesses mittels Dreieckstheorie. Es wurden Vergleichsstudien einer Viersäulen SMB sowie einer Einsäulen SMB mit Verweilzeitstrecken oder Zonentanks simuliert. Zwischen 4-SMB und 1-SMB mit Verweilzeitstrecken konnten kaum Unterschiede festgestellt werden. Beide erreichen 100 % Ausbeute und Reinheit sowie die gleiche Produktivität. Bei der Verwendung von Rührkesseln verschlechtert sich die Trennung jedoch. Grund dafür ist, dass die Konzentrationsprofile in den Tanks nicht erhalten bleiben. Eine der 4-SMB vergleichbare Trennung ist mit Rührkesseln als Zonentanks möglich, sofern ein Arbeitspunkt weiter entfernt vom optimalen Betriebspunkt gewählt wird. Grundsätzlich gilt das Konzept damit als valide und sollte experimentell überprüft werden.

Die iCCC zeigte in Simulationsstudien eine bessere Leistung als ein vergleichbarer Batch-Lauf. Bei leicht besserer Reinheit können über 15 % Ausbeute (absolut) gewonnen werden. Zudem verdoppelt sich die Produktivität.

In experimentellen Studien wird dieser Trend belegt. Hier konnte, relativ betrachtet, bis zu 50 % Ausbeute und 233 % Produktivität gewonnen werden. Weiterhin wurde der Eluentenverbrauch halbiert. Als problematisch erwies sich hier die Produktdegeneration. Zudem ist die Prozesssteuerung auf der eigentlich für die Batch Chromatographie ausgelegten Anlage problematisch. Die Stabilität des Prozesses wird maßgeblich von der Lage der Fraktionsschnittpunkte geprägt.

Kontinuierliche Membranchromatographie basierend auf dem iCCC Konzept war mit den gegebenen Modulen und dem verwendeten Stoffsystem nicht möglich. Der Grund hierfür lag in extrem unsymmetrischen Peaks. Diese verhinderten sinnvolle Fraktionen zum Wiederbeladen in den folgenden Zyklen. Es wurden ähnliche Leistungsparameter wie für einen

korrespondierenden Batch-Lauf ermittelt. Grundsätzlich wäre eine Änderung des Moduldesigns von Membranadsorbern anzustreben, um die Asymmetrie der Peaks zu minimieren.

Für eine sequentielle Verschaltung waren, bei gleicher Ausbeute und Reinheit, eine bis zu 71 % höhere Produktivität im Vergleich zum Batch Prozess möglich. Der Eluentenverbrauch sank gleichzeitig um 38 %.

Um Chromatographieprozesse automatisieren zu können wurde die Inline Concentration Measurement (ICM) entwickelt. Dabei handelt es sich um eine auf UV/VIS Daten basierende Spektralanalyse. Es wurden zwei unterschiedliche Methoden vorgestellt. Für Stoffe mit relativ unterschiedlichen UV/VIS Spektren eignet sich die Auswertung des Lambert-Beer'schen Gesetzes bei bekannten Extinktionskoeffizienten. Diese sind relativ einfach zu bestimmen. An einem Beispielsystem aus Chymotrypsinogen-A, Cytochrom-C und Lysozym auf einer Kationenaustausch-Säule wurde eine Genauigkeit der Methode von ca. 99,98 % ermittelt. Aus der offline Analytik bekannte Methoden zur Bestimmung des Proteingehalts lieferten im Vergleich Fehler zwischen 16,99 % und 21,27 %.

Am Beispiel von IgG Monomer und Dimer wurde eine zweite Methode für Komponenten mit sehr ähnlichen UV/VIS Spektren vorgestellt. Das hierfür mittels SIMPLS-Algorithmus erstellte statistische Modell erreichte für dieses Testsystem ein Bestimmtheitsmaß von 0,98. Der „root mean square error of prediction“ (RMSEP) lag bei 0,13 mg/l für IgG Monomer und 0,019 mg/l für IgG Dimer.

Auf Grund der geringen Berechnungszeit von weniger als 100 ms eignen sich beide Methoden zur Prozessautomatisierung. Ein Einsatz in der Chromatographie zur Fraktionierung des Produktes basierend auf inline ermittelten Reinheiten ist ebenso denkbar wie die vollständige Automatisierung kontinuierlicher Prozesse. Die Methodik ist weiterhin auch auf andere Grundoperationen übertragbar.

Der ICM gesteuerte und automatisierte Betrieb der iCCC ist der nächste logische Schritt, der sich an diese Arbeit anschließen sollte. Im Hinblick auf „Smart Manufacturing“ Konzepte währe weiterhin die Einbeziehung von Autosamplern zur selbstständigen Kalibrierung der ICM zu prüfen. In Kombination mit geeigneter Prozess Analyse Technologie für die

vorhergehenden [Kornecki 2018] und nachfolgenden Schritte wäre die Entwicklung einer voll automatisierten Anlage zu prüfen.

7. Symbolverzeichnis

7.1 Formelzeichen

a_i	[-]	Synonymer Parameter für den Henry-Koeffizienten
$a_{1,i}$	[mg/mmol]	Parameter zur Beschreibung der Salzabhängigkeit der maximalen Beladung $q_{max,i}$
$a_{2,i}$	[mg/ml]	Parameter zur Beschreibung der Salzabhängigkeit der maximalen Beladung $q_{max,i}$
b_i	[ml/mg]	Synonymer Parameter für den Langmuir-Koeffizienten
$b_{1,i}$	[l/mol]	Parameter zur Beschreibung der Salzabhängigkeit des Henry-Koeffizienten H_i
$b_{2,i}$	[-]	Parameter zur Beschreibung der Salzabhängigkeit des Henry-Koeffizienten H_i
Bo	[-]	Bodenstein-Zahl
c_i	[mg/ml]	Konzentration der Komponente i
c_i^{init}	[mg/ml]	Konzentration der Komponente i auf dem vorherigen Plateau (Initialwert)
$c_{Eingang}$	[mg/ml]	Konzentration der Komponente i am Kolonneneingang
$c_{Feed,i}$	[mg/ml]	Feedkonzentration der Komponente i
$c_{GGW,i}$	[mg/ml]	Gleichgewichtskonzentration der Komponente i
$c_{in,i}$	[mg/ml]	Einlaufkonzentration der Komponente i
$c_{out,i}$	[mg/ml]	Auslaufkonzentration der Komponente i
$c_{p,i}$	[mg/ml]	Konzentration der Komponente i innerhalb der Pore
c_{Salz}	[mol/l]	Salzkonzentration
c_t	[mg/ml]	Gesamtkonzentration
CV	[ml]	Kolonnenvolumen (engl. Column Volume)
d	[cm]	Wegstrecke der Durchleuchtung
$d_{1,i}$	[mg/mmol]	Parameter zur Beschreibung der Salzabhängigkeit des linearen Terms für modifizierte Langmuir-Isothermen bei der HIC
$d_{2,i}$	[mg/ml]	Parameter zur Beschreibung der Salzabhängigkeit des linearen Terms für modifizierte Langmuir-Isothermen bei der HIC
D_{ax}	[cm ² /s]	Axiale Dispersion der Komponente i
$D_{eff,i}$	[cm ² /s]	Effektiver Diffusionskoeffizient der Komponente i in den Poren
$D_{m,i}$	[cm ² /s]	Molekularer Diffusionskoeffizient der Komponente i
$D_{p,i}$	[cm ² /s]	Porendiffusionskoeffizient der Komponente i
$D_{S,i}$	[cm ² /s]	Oberflächendiffusionskoeffizient der Komponente i
d_p	[cm]	Partikeldurchmesser
$E_{\lambda,i}$	[mAu]	Extinktion der Komponente i bei der Wellenlänge λ
H_i	[-]	Henry-Koeffizient der Komponente i
$I_{0,\lambda}$	[W/m ²]	Intensität des emittierten Lichts der Wellenlänge λ

$I_{t,\lambda}$	[W/m ²]	Intensität des transmittierten Lichts der Wellenlänge λ
K_i	[ml/mg]	Langmuir-Koeffizient der Komponente i
k_B	[J/K]	Boltzmann-Konstante
k_{eff}	[cm/s]	Effektiver Stofftransportwiderstand
$k_{f,i}$	[cm/s]	Stofftransportwiderstand der Komponente i durch den Film
kla	[1/s]	Kombinierter effektiver Stofftransportwiderstand
l	[cm]	Charakteristische Wegstrecke / Länge
L	[cm]	Länge der Säule
M	[g/mol]	Molare Masse
$m_{i,inj}$	[mg/ml]	Injizierte Masse der Komponente i
m_j	[-]	Massenstromverhältnis der Zone j
N_A	[1/mol]	Avogadro-Konstante
Pe_i	[-]	Peclet-Zahl der Komponente i
q_i	[mg/ml]	Beladung der Komponente i auf der stationären Phase
q_i^{init}	[mg/ml]	Beladung der stationären Phase mit Komponente i auf dem vorhergehenden Plateau (Initialwert)
$q_{max,i}$	[mg/ml]	Maximale Beladung der Komponente i
r	[cm]	Radius
r_{pore}	[cm]	Porenradius
$R_{0,i}$	[cm]	Hydrodynamischer Radius der Komponente 1
R_p	[cm]	Partikelradius
Re	[-]	Reynolds-Zahl
Re_p	[-]	Reynolds-Zahl für umströmte Partikel
Sh_i	[-]	Schmidt-Zahl der Komponente i
t	[min]	Zeit
T	[K]	Temperatur
\bar{t}_i	[min]	Mittlere Verweilzeit der Komponente i
t_0	[min]	Totzeit
$t_{th,i}$	[min]	Theoretische Verweilzeit der Komponente i
t_{schalt}	[min]	Schaltzeit
u_{int}	[cm/s]	Interstitielle (hier Interpartikuläre) Strömungsgeschwindigkeit
v	[cm/s]	Strömungsgeschwindigkeit
V	[ml]	Volumen
\dot{V}	[ml/min]	Volumenstrom
V_{Ads}	[ml]	Adsorbervolumen
V_B	[ml]	Bettvolumen
\dot{V}_B	[ml/min]	Volumenstrom der festen (Bulk) Phase
\dot{V}_{Eluent}	[ml/min]	Volumenstrom des Eluenten / der Eluentenpumpe

\dot{V}_{Extrakt}	[ml/min]	Volumenstrom des Extrakts / der Extraktpumpe
V_{Feed}	[ml]	Feedvolumen
\dot{V}_{Feed}	[ml/min]	Volumenstrom des Feeds / der Feedpumpe
\bar{V}_i	[ml/mol]	Molares Volumen der Komponente i
\dot{V}_{in}	[ml/min]	Einlaufvolumenstrom
$\dot{V}_{\text{Kreislauf}}$	[ml/min]	Kreislaufstrom / Volumenstrom der Kreislaufpumpe
$\dot{V}_{L,j}$	[ml/min]	Volumenstrom der flüssigen Phase in der Zone j
\dot{V}_{out}	[ml/min]	Auslaufvolumenstrom
\dot{V}_r	[ml/min]	Volumenstrom in radialer Richtung an der Stelle r
$\dot{V}_{\text{Raffinat}}$	[ml/min]	Volumenstrom des Raffinats / der Raffinatpumpe
$V_{\text{Säule}}$	[ml]	Volumen der (leeren) Säule
\dot{V}_x	[ml/min]	Volumenstrom in axialer Richtung an der Stelle x

7.2 Griechische Symbole

$\varepsilon_{p,i}$	[-]	Porosität des Partikels in Abhängigkeit der Komponente i
ε_s	[-]	Porosität der Schüttung
ε_t	[-]	Totale Porosität
$\varepsilon_{\lambda,i}$	[cm ² /mg]	Extinktionskoeffizient bezogen auf eine Kalibrierung in Massenkonzentrationen
η	[mg/cm s]	Dynamische Viskosität
λ	[nm]	Wellenlänge
$\lambda_{m,i}$	[-]	Verhältnis Protein- zu Porenradius
ρ	[mg/ml]	Dichte
σ^2	(hier) [min ²]	Varianz
τ_i	[-]	Tortuositätsfaktor
$\psi_{p,i}$	[-]	Diffusiver Hinderungskoeffizient

7.3 Abkürzungen

1-SMB		Einsäulen Simulated Moving Bed Chromatography
4-SMB		Viersäulen Simulated Moving Bed Chromatography
ATPE		Wässrige Zweiphasen Extraktion (engl. A queous T wo P hase E xtraction)
BET		Isotherme nach Brunauer, Emmett und Teller
C5		Cyclopentanon
C7		Cycloheptanon
CGS		Einheitensystem: Zentimeter, Gramm, Sekunde (engl. centimeter, gram, second)

CHO		C hinese H amster O vary
CSV		C omma S eparated V alue
CV		Kolonnenvolumen (engl. C olumn V olume)
DAD		D ioden A rray D etektor
DNA		Desoxiribonukleinsäure (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
E		E luent
F		F raktion
FDA		F ood & D rug A ministration
FTIR		F ourier- t ransformierte I nfrarotspektroskopie
GMP		Gute Herstellpraxis (engl. G ood M anufacturing P ractice)
GRM		G eneral R ate M odel
HCP		Wirtszellproteine (engl. H ost C ell P rotein)
HIC		H ydrophobe I nteraktionschromatographie
HPLC		H igh P erformance L iquid C hromatography
iCCC		integrated C ontinuous C ountercurrent C hromatography
ICM		Inline Konzentrationsmessung (engl. inline c oncentration m easurement)
IEX		Ionenaustausch Chromatographie (engl. I on E xchange C hromatography)
IgG		I mmunglobulin G
JVM		J ava V irtual M achine
LV		L atente V ariable
mAb		monoklonaler Antikörper (engl. m onoclonal A ntibody)
MCSGP		M ulticolumn C ountercurrent S olvent G radient P urification
MIR		Infrarot Licht im mittleren Wellenlängenbereich (engl. m id I nfrared)
NaPi		N atriumphosphat Puffer
NIPALS		N on- L inear I terative P artial L east S quares Algorithmus
NK		N ebenkomponente
NNLS		N on- n egative L east S quares Algorithmus
NP		N ormal P hase
P		P rodukt
PAT		P rozess A nalyse T echnologie
PLS		P artial L east S quares Regression
P/S		P rodukt und S tarkbinder enthaltende Fraktion
RMSEC		Mittlerer Kalibrationsfehler (engl. r oot m ean s quare e rror of c alibration)
RMSEP		Mittlerer Vorhersagefehler (engl. r oot m ean s quare e rror of p rediction)
RP		Umkehrphase (engl. R eversed P hase)
RPM		Umdrehungen pro Minute (engl. r ounds p er m inute)
S		S tarkbinder
SEC		Größenausschluss Chromatographie (engl. S ize E xclusion

		Chromatography)
SMA		S teric M ass A ction
SMB		S imulated M oving B ed
SMCC		S equential M ulticolumn C hromatography
TMB		T rue M oving B ed
UV		U ltraviolette S Licht
VIP		V ariable Importance on P rojections
VIS		Sichtbares Licht (engl. V isible Light)
W		Schwachbinder (engl. w weak binder)
W/P		Schwachbinder (w weak binder) und P rodukt enthaltende Fraktion

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Bindung von IgG Molekülen [Yadav 2012] an die Oberfläche eines Kationenaustauscher Adsorbens. Die Farben symbolisieren dabei positive (Blau) respektive negative Ladung (Rot).....	6
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Verdrängung der IgG Moleküle von den Bindungsstellen mittels stärkerer Bindungspartner, hier Ionen.	7
Abbildung 3: Zeitlicher Verlauf der Salzkonzentration (rot) bei einer Gradientenelution mit Sprunganstieg zur Regeneration [Amersham 2004].	7
Abbildung 4: Schematische Darstellung mehrerer Injektionen auf eine Chromatographiesäule. Die schneller wandernde Komponente (blau) holt die langsamere (rot) ein.	11
Abbildung 5: True Moving Bed Prozess. Die Bewegung der festen Phase (grüne Pfeile) läuft im Gegenstrom zur der flüssigen Phase (schwarze Pfeile).	11
Abbildung 6: Simulated Moving Bed Prozess.	12
Abbildung 7: Kolonnenprofile einer acht Säulen SMB am Zyklusende.....	13
Abbildung 8: Dreiecksdiagramm für ein Zweikomponenten Gemisch.	16
Abbildung 9: Multicolumn Countercurrent Solvent Gradient Purification (MCSGP) [Müller-Späth 2014].....	19
Abbildung 10: Taktschema einer Twincolumn MCSGP [Krättli 2013].....	20
Abbildung 11: Schematische Darstellung einer sequentiellen Chromatographie Verschaltung.	21
Abbildung 12: Fließbilder eines Zyklus einer 1-SMB. Dargestellt ist das Taktende kurz vor Weiterschaltung in die nächste Zone.....	22
Abbildung 13: Reduziertes Anlagendesign für die 1-SMB, beispielhaft für Zone II.....	24
Abbildung 14: Chromatogramm einer Ionenaustausch Chromatographie. In grau dargestellt ist die Salzkonzentration als linearer Gradient (gestrichelte Linie) oder Stufengradient (durchgezogene Linie).....	25
Abbildung 15: Chromatogramm einer Hydrophoben Interaktionschromatographie. Die farbigen, gepunkteten Linien deuten den erwarteten Verlauf nach mehreren Wiederbeladungszyklen an.....	27
Abbildung 16: Prozessschema der Integration einer Ionenaustausch und einer Hydrophoben Interaktionschromatographie zur integrated Counter Current Chromatographie (iCCC).	28
Abbildung 17: Strömungs- bzw. Diffusionsverlauf an einem Partikel in der konvektiven Kernströmung. Die durchgezogene Linie symbolisiert die Bewegung eines Teilchens. Die gepunktete Linie stellt die Phasengrenze dar. Die gestrichelte Linie den Strömungsverlauf der Kernströmung um den Partikel. Der blaue Farbverlauf deutet den Konzentrationsverlauf an.....	33

Abbildung 18: Beladung der stationären Phase in Abhängigkeit von der Gleichgewichtskonzentration. Aufgetragen für zwei Komponenten, entsprechend der Langmuir-Isotherme.	37
Abbildung 19: Modellierungsansatz für die Beschreibung der Chromatographischen Anlage inklusive der Säule.	38
Abbildung 20: Überblick über fluiddynamische Modelle für Membranchromatographie Module. A: Axiales Dispersionsmodell einer Chromatographiesäule; B: Roper-Lightfoot Model [Roper 1995]; C: Zonal Rate Model [Francis 2011, Francis 2012].	40
Abbildung 21: Fluiddynamische Verteilung in einem Membranchromatographiemodul.	41
Abbildung 22: Abhängigkeit der Porosität des Festbetts von der Molekülgröße.	46
Abbildung 23: Beispiel einer Durchbruchskurve für 5 g/l Feedkonzentration.	53
Abbildung 24: Vergleich zwischen gemessenen (Punkte) und simulierten (Linien) Verweilzeitverläufen bei unterschiedlichen Injektionsvolumina und Strömungsgeschwindigkeiten für eine analytische Chromatographie-Anlage.	63
Abbildung 25: Vergleich zwischen gemessenen (Punkte) und simulierten (Linien) Verweilzeitverläufen bei unterschiedlichen Strömungsgeschwindigkeiten und unterschiedlichen Komponenten (Aceton (blau), Dextran 25 kDa (rot)) für die Anlage im präparativen Maßstab.	64
Abbildung 26: Einfluss des Tortuositätsfaktors auf das Simulationsergebnis am Beispiel von IgG auf der IEX Säule bei 1,0 ml/min.	66
Abbildung 27: Einfluss des Partikeldurchmessers d_p auf das Simulationsergebnis am Beispiel von Aceton bei 0,131 ml/min auf der IEX Säule.	67
Abbildung 28: Isothermenschar für IgG Monomer auf Fractogel® EMD SO_3^- bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen.	69
Abbildung 29: Gemessene (gestrichelte Linien) und simulierte (durchgezogene Linien) Chromatogramme von Fermentationsbrühe auf der Ionenaustausch Chromatographiesäule bei unterschiedlichen Gradientensteigungen.	70
Abbildung 30: Vergleich zwischen Simulationsergebnissen (durchgezogene Linien) und SEC Fraktionen (Messpunkte) für die Hydrophobe Interaktions Chromatographie.	71
Abbildung 31: Langmuir-Isothermen für Cycloheptanon (C7) und Cyclopentanon (C5).	72
Abbildung 32: Vergleich zwischen gemessenen (gepunktet Linien) und simulierten (durchgezogene Linien) Verläufen für Cyclopentanon (rot) und Cycloheptanon (blau) auf einer Normalphasen Chromatographiesäule	74
Abbildung 33: Fluiddynamische Verteilung in einem Membranchromatographiemodul.	75
Abbildung 34: Vergleich zwischen gemessenen (blaue Punkte) und simulierten (rote Linie) Verweilzeitverläufen für Membranadsorbermodule.	76

Abbildung 35: Langmuir-Isotherme bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen für IgG auf einer Ionenaustausch Membran (a) und einer hydrophoben Interaktions-Membran (b).	77
Abbildung 36: Vergleich zwischen experimentellen (blaue Punkte) und simulierten (rote Linie) Chromatographie Verläufen des hydrophoben Interaktions-Moduls bei einem Gradienten von 5 CV.	79
Abbildung 37: Langmuir-Isothermen für Cycloheptanon (C7) und Cyclopentanon (C5) auf LiChroprep® SI 60.....	81
Abbildung 38: Dreiecksdiagramm für die Bestimmung der Arbeitspunkte.	82
Abbildung 39: SMB Chromatogramme für den Arbeitspunkt 1 (a) und Arbeitspunkt 2 (b). Dargestellt ist das Taktende. Das Cyclopentanon ist die rote, das Cycloheptanon die blaue Komponente. Die durchgezogenen Linien gehören zur 4-Säulen SMB. Die 1-SMB mit Verweilzeitstrecken ist gestrichelt, mit Tanks gepunktet dargestellt.	83
Abbildung 40: iCCC Simulationen, Lauf 1: (a) IEX Säule; (b) HIC Säule.....	86
Abbildung 41: iCCC Simulationen, Lauf 1: Verlauf von Ausbeute und Reinheit (a) sowie Monomer Konzentration (b) über die Anzahl der Zyklen.	87
Abbildung 42: iCCC Simulationen, Lauf 3: (a) IEX Säule; (b) HIC Säule.....	87
Abbildung 43: iCCC Simulationen, Lauf 3: Verlauf von Ausbeute und Reinheit (a) sowie Monomer Konzentration (b) über die Anzahl der Zyklen.	88
Abbildung 44: iCCC Experimente, Lauf 1: Oben: Chromatogramme der Ionenaustausch-Säule, Unten: Chromatogramme der Hydrophoben Interaktions-Säule.	90
Abbildung 45: iCCC Experimente, Lauf 1: (a) Verlauf von Ausbeute und Reinheit, gemessen mit offline SEC Chromatographie. (b) Verlauf der Ausbeute, gemessen inline über die Peakflächen zwischen den Schnittpunkten.....	91
Abbildung 46: iCCC Experimente, Lauf 2: Oben: Chromatogramme der Ionenaustausch-Säule, Unten: Chromatogramme der Hydrophoben Interaktions-Säule.	93
Abbildung 47: iCCC Experimente, Lauf 2: (a) Verlauf von Ausbeute und Reinheit, gemessen mit offline SEC Chromatographie. (b) Verlauf der Ausbeute, gemessen inline über die Peakflächen zwischen den Schnittpunkten.....	94
Abbildung 48: iCCC Experiment, Lauf 3: Verlauf von Ausbeute (grün) sowie der Beladung der Ionenaustausch-Säule (blau) und Hydrophoben Interaktions-Säule (rot). Die gestrichelten Linien geben 100 % Ausbeute (oben) bzw. die Beladung der Säule im Batch Fall (unten) an.	95
Abbildung 49: iCCC Experimente, Lauf 3: Oben: Chromatogramme der Ionenaustausch-Säule, Unten: Chromatogramme der Hydrophoben Interaktions-Säule.	96
Abbildung 50: iCCC Experimente, Lauf 4: Oben: Chromatogramme der Ionenaustausch-Säule, Unten: Chromatogramme der Hydrophoben Interaktions-Säule.	97

Abbildung 51: Simulierte iCCC Verläufe: (a) Ionenaustausch-Modul; (b) Hydrophobe Interaktions-Modul.....	100
Abbildung 52: Einfluss der Anzahl an Modulen auf die Beladung des ersten Moduls in der Kette. Blaue Säulen: Beladung des Moduls; Rote Säulen: Steigerung bezogen auf eine Säule.....	101
Abbildung 53: Experimentelle Bestimmung des Druckverlusts über ein Modul in Abhängigkeit vom Volumenstrom.	102
Abbildung 54: Vergleich zwischen Messungen und Simulationen für mehrere Membranlagen in einer Glassäule.....	105
Abbildung 55: Exemplarische Darstellung der Summation dreier Einzelspektren (rote, grüne und blaue Linien) zum Summenspektrum (violette Linie).....	112
Abbildung 56: UV/VIS Spektren der Reinstoffproben von Chymotrypsinogen-A, Cytochrom-C und Lysozym bei 0,01 g/l.....	121
Abbildung 57: Inline Concentration Measurement des Dreistoffgemischs Chymotrypsinogen-A, Cytochrom-C und Lysozym auf einer Ionenaustausch-Säule unter analytischen Bedingungen.	122
Abbildung 58: Vergleich zwischen Reinstoffinjektion (blaue) und ICM Messung des Dreistoffgemischs (rot) für (a) Chymotrypsinogen-A; (b) Cytochrom-C; (c) Lysozym	123
Abbildung 59: Vergleich von Elutionsprofilen. Die Verläufe in hellblau bzw. grün wurden inline mit ICM gemessen. Die Verläufe in schwarz bzw. grau wurden nach dem Lauf über Gauß-Funktionen respektive modifizierte Gauß-Funktionen an das Extinktionssignal angepasst.	124
Abbildung 60:(a) z- transformierte UV/VIS Spektren der Trainings Sets mit dem höchsten und niedrigsten IgG Monomer Gehalt. Rote Punkte repräsentieren die Werte für die Mischung aus 100 vol.-% Monomer SEC Fraktion, grüne Punkte zeigen die Werte für 100 vol.-% Dimer. Da eine Umwandlung von Monomer zu Dimer und umgekehrt stattfindet, sind in beiden Proben dennoch auch die jeweils andere Komponente vorhanden. (b) Variable Importance on Projections (VIP) Werte der einzelnen Wellenlängen für die Bestimmung der Konzentration von Monomer (rot) and Dimer (grün).	126
Abbildung 61: (a) Loading über Wellenlängen für die ersten acht Latenten Variablen. Je höher der Absolutwert ist, desto wichtiger ist diese Wellenlänge für die jeweilige Latente Variable; (b) Loadings der Y Resultate über die Latenten Variablen. Je höher der Absolutwert ist, desto wichtiger ist die jeweilige Latente Variable für die Berechnung der Monomer (rot) bzw. Dimer (grün) Konentration.....	126
Abbildung 62: Konzentrationsmessungen über die Zeit von IgG Monomer und Dimer nach der Injektion in einen kontinuierlich durchströmten Rührkessel: (a) für ein volumetrisches Mischungsverhältnis der SEC Fraktionen von 80 % Monomer und 20 % Dimer, (b) für ein volumetrisches Mischungsverhältnis von 20 % Monomer und 80 % Dimer.....	127
Abbildung 63: Vergleich zwischen mittels Fraktionierung und SEC Chromatographie gemessenen und mit Inline Concentration Measurement gemessenen Konzentrationen. ..	128

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Gleichungen für die charakteristischen Punkte im Dreiecksdiagramm:	17
Tabelle 2: Vergleichswerte zwischen gemessenen und simulierten Verweilzeitverläufen für die analytischen Anlagen:.....	64
Tabelle 3: Vergleichswerte zwischen gemessenen und simulierten Verweilzeitverläufen für die präparative Anlage:.....	65
Tabelle 4: Zusammenfassung der Validierungsversuche der Fluidodynamik von selbstgepackten Glassäulen mit partikulären Adsorbentien:.....	68
Tabelle 5: Isothermenparameter aus Schüttelversuchen für Fractogel® EMD SO ₃ ⁻ und EMD Phenyl:	69
Tabelle 6: Zusammenfassung des Vergleichs zwischen Messungen und Simulationsergebnissen für IgG Fermentationsbrühe auf Ionenaustausch- und Hydrophoben Interaktions Chromatographiesäulen bei unterschiedlichen Gradientensteigungen:	70
Tabelle 7: Zusammenfassung der Validierungsversuche für die Normalphasen Chromatographiesäule:	74
Tabelle 8: Isothermenparameter für IgG aus Protein A Analysen für Schüttelversuche von Sartobind® S und Sartobind® Phenyl:	78
Tabelle 9: Zusammenfassung der Validierungsversuche für Membranchromatographie Module:	78
Tabelle 10: Betriebsparameter für die SMB Läufe:	82
Tabelle 11: Übersicht über die Leistungskennzahlen der 4-SMB und der 1-SMB Varianten für beide Arbeitspunkte:.....	84
Tabelle 12: Vergleich der Prozesskennzahlen für den Batch Betrieb und die iCCC Läufe: ...	89
Tabelle 13: Parameter, Ergebnisse und Kenngrößen der exp. Studien:	97
Tabelle 14: Prozessparameter und Ergebnisse für die IgG Fallstudien:.....	104
Tabelle 15: Abweichung der mittleren Verweilzeit zwischen Einzelkomponenten- und Gemisch Injektion:.....	123
Tabelle 16: Prozentuale Abweichung der gemessenen Proteinmasse von der injizierten Proteinmasse für unterschiedliche Bestimmungsmethoden:.....	123

10. Literaturverzeichnis

- [Abel 2004] Abel, S., Mazzotti, M., Morbidelli, M. (2004): *Solvent gradient operation of simulated moving beds*, *Journal of chromatography A*, 1026 (1–2), 47–55, DOI: 10.1016/j.chroma.2003.11.054
- [Abunasser 2003] Abunasser, N., Wankat, P. C., Kim, Y.-S., Koo, Y. M. (2003): *One-Column Chromatograph with Recycle Analogous to a Four-Zone Simulated Moving Bed*, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 42 (21), 5268–5279, DOI: 10.1021/ie030283e
- [Abunasser 2005] Abunasser, N., Wankat, P. (2005): *Ternary Separations with One-Column Analogs to SMB*, *Separation Science and Technology*, 40 (16), 3239–3259, DOI: 10.1080/01496390500423615
- [Abunasser 2006] Abunasser, N., Wankat, P. C. (2006): *Improving the performance of one column analogs to SMBs*, *AIChE Journal*, 52 (7), 2461–2472, DOI: 10.1002/aic.10867
- [Agilent Technologies 2016] Agilent Technologies (2016): *The LC Handbook, Guide to LC Columns and Method Development*, 2.Aufl., USA
- [Ahuja 2000] Ahuja, Satinder (2000): *Handbook of bioseparations*, Separation science and technology, v. 2, Academic Press, San Diego, CA
- [Allison 2014] Allison, N., Richards, J. (2014): *Current status and future trends for disposable technology in the biopharmaceutical industry*, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 89 (9), 1283–1287, DOI: 10.1002/jctb.4277
- [Altenhöner 1997] Altenhöner, U., Meurer, M., Strube, J., Schmidt-Traub, H. (1997): *Parameter estimation for the simulation of liquid chromatography*, *Journal of chromatography A*, 769 (1), 59–69, DOI: 10.1016/S0021-9673(97)00173-8
- [Am Ende 2010] Am Ende (2010): *Chemical Engineering in the Pharmaceutical Industry, R&D to Manufacturing*, John Wiley & Sons Inc, Hoboken
- [Amersham 1993] Amersham (1993): *Hydrophobic Interaction Chromatography, Principles and Methods*
- [Amersham 2001] Amersham (2001): *Protein Purification, Handbook*
- [Amersham 2002a] Amersham (2002): *Affinity Chromatography, Principles and Methods*
- [Amersham 2002b] Amersham (2002): *Gel Filtration, Principles and Methods*
- [Amersham 2002c] Amersham (2002): *Ion Exchange Chromatography, Principles and Methods*
- [Amersham 2004] Amersham (2004): *Ion Exchange Chromatography & Chromatofocusing; Principles and Methods*
- [Andersson 2009] Andersson, M. (2009): *A comparison of nine PLS1 algorithms*, *J. Chemometrics*, 23 (10), 518–529, DOI: 10.1002/cem.1248
- [Angelo 2018] Angelo, J., Pagano, J., Müller-Späth, T., Mhlbacher, K., Chollangi, S., Xu, X., Ghose, S., Li, Z. J. (2018): *Scale-Up of Twin-Column*

- Periodic Counter-Current Chromatography for MAb Purification, BioProcess International, 16 (4), DOI:*
- [Araújo 2007] Araújo, J. M. M., Rodrigues, Rui C. R., Ricardo J.S. Silva, Mota, José P. B. (2007): *Single-column Simulated Moving-bed Process with Recycle Lag: Analysis and Applications, Adsorption Science & Technology, 25 (9), 647–659, DOI:*
- [Atkins 2012] Atkins (2012): *Physikalische Chemie, 4. Aufl., WILEY-VCH, Weinheim*
- [Aumann 2007a] Aumann, L., Morbidelli, M. (2007): *A continuous multicolumn countercurrent solvent gradient purification (MCSGP) process, Biotechnology and Bioengineering, 98 (5), 1043–1055, DOI: 10.1002/bit.21527*
- [Aumann 2007b] Aumann, L., Stroehlein, G., Morbidelli, M. (2007): *Parametric study of a 6-column countercurrent solvent gradient purification (MCSGP) unit, Biotechnology and Bioengineering, 98 (5), 1029–1042, DOI: 10.1002/bit.21529*
- [Aumann 2008] Aumann, L., Morbidelli, M. (2008): *A semicontinuous 3-column countercurrent solvent gradient purification (MCSGP) process, Biotechnology and Bioengineering, 99 (3), 728–733, DOI: 10.1002/bit.21585*
- [Bachem 1995] Bachem (1995): *Mathematik in der Praxis, Fallstudien aus Industrie, Wirtschaft, Naturwissenschaften und Medizin, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg*
- [Baldwin 1996] Baldwin, R. L. (1996): *How Hofmeister ion interactions affect protein stability, Biophysical Journal, 71 (4), 2056–2063, DOI: 10.1016/S0006-3495(96)79404-3*
- [Baur 2016] Baur, D., Angarita, M., Muller-Spath, T., Steinebach, F., Morbidelli, M. (2016): *Comparison of batch and continuous multi-column protein A capture processes by optimal design, Biotechnology Journal, 11 (7), 920–931, DOI: 10.1002/biot.201500481*
- [Belcheva 2004] Belcheva, D. (2004): *Theoretische und experimentelle Studie der Gradienten-Gegenstromchromatographie unter linearen Bedingungen (Phd, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg*
- [Bjellqvist 1993] Bjellqvist, B., Hughes, G. J., Pasquali, C., Paquet, N., Ravier, F., Sanchez, J.-C., Frutiger, S., Hochstrasser, D. (1993): *The focusing positions of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino acid sequences, Electrophoresis, 14 (1), 1023–1031, DOI: 10.1002/elps.11501401163*
- [Blümel 1998] Blümel, C., Kniep, H., Seidel-Morgenstern, A., in Elsevier **1998**
- [Boi 2007] Boi, C., Dimartino, S., Sarti, G. C. (2007): *Modelling and simulation of affinity membrane adsorption, Journal of chromatography. A, 1162 (1), 24–33, DOI: 10.1016/j.chroma.2007.02.008*

- [Borrmann 2009] Borrmann, C., Strube, J., Sommerfeld, S., Lohrmann, M. (2009): *Kombination von hydrophober Interaktions- und Ionenaustauschchromatographie*, *Chemie Ingenieur Technik*, 81 (8), 1239–1240, DOI: 10.1002/cite.200950067
- [Borrmann 2011] Borrmann, C., Helling, C., Lohrmann, M., Sommerfeld, S., Strube, J. (2011): *Phenomena and Modeling of Hydrophobic Interaction Chromatography*, *Separation Science and Technology*, 46 (8), 1289–1305, DOI: 10.1080/01496395.2011.561515
- [Borrmann 2012] Borrmann (2012): *Methode zur Auslegung von integrierten Downstream Processing Verfahren am Beispiel der hydrophoben Interaktions- und Ionenaustauschchromatographie*, Thermische Verfahrens- und Prozesstechnik, Shaker, Aachen
- [Brestrich 2014] Brestrich, N., Briskot, T., Osberghaus, A., Hubbuch, J. (2014): *A tool for selective inline quantification of co-eluting proteins in chromatography using spectral analysis and partial least squares regression*, *Biotechnology and Bioengineering*, 111 (7), 1365–1373, DOI: 10.1002/bit.25194
- [Brestrich 2015] Brestrich, N., Sanden, A., Kraft, A., McCann, K., Bertolini, J., Hubbuch, J. (2015): *Advances in inline quantification of co-eluting proteins in chromatography: Process-data-based model calibration and application towards real-life separation issues*, *Biotechnology and Bioengineering*, 112 (7), 1406–1416, DOI: 10.1002/bit.25546
- [Brestrich 2016] Brestrich, N., Hahn, T., Hubbuch, J. (2016): *Application of spectral deconvolution and inverse mechanistic modelling as a tool for root cause investigation in protein chromatography*, *Journal of chromatography. A*, 1437, 158–167, DOI: 10.1016/j.chroma.2016.02.011
- [Brestrich 2018] Brestrich, N., Rüdts, M., Büchler, D., Hubbuch, J. (2018): *Selective protein quantification for preparative chromatography using variable pathlength UV/Vis spectroscopy and partial least squares regression*, *Chemical Engineering Science*, 176, 157–164, DOI: 10.1016/j.ces.2017.10.030
- [Bro 1997] Bro, R., Jong, S. de (1997): *A fast non-negativity-constrained least squares algorithm*, *J. Chemometrics*, 11 (5), 393–401, DOI: 10.1002/(SICI)1099-128X(199709/10)11:5<393:AID-CEM483>3.0.CO;2-L
- [Brooks 1992] Brooks, C. A., Cramer, S. M. (1992): *Steric mass-action ion exchange*, *AIChE J.*, 38 (12), 1969–1978, DOI: 10.1002/aic.690381212
- [Camperi 1999] Camperi, Navarro, d. C. A., Wolman, Smolko, Cascone, Grasselli (1999): *Protein adsorption onto tentacle cation-exchange hollow-fiber membranes*, *Biotechnology progress*, 15 (3), 500–505, DOI: 10.1021/bp990054g

- [Capito 2013] Capito, F., Skudas, R., Kolmar, H., Stanislawski, B. (2013): *Host cell protein quantification by Fourier transform mid infrared spectroscopy (FT-MIR)*, *Biotechnology and Bioengineering*, 110 (1), 252–259, DOI: 10.1002/bit.24611
- [Carroll 2009] Carroll, S. (2009): *Goodbye blockbuster medicines; hello new pharmaceutical business models*, *Pharmaceutical journal*, 282 (7555), 681–682, DOI:
- [Carta 2010] Carta (2010): *Protein chromatography, Process development and scale-up*, WILEY-VCH, Weinheim
- [Cavazzini 2003] Cavazzini, A., Felinger, A., Guiochon, G. (2003): *Comparison between adsorption isotherm determination techniques and overloaded band profiles on four batches of monolithic columns*, *Journal of chromatography A*, 1012 (2), 139–149, DOI: 10.1016/S0021-9673(03)01185-3
- [Charcosset 1998] Charcosset, C. (1998): *Review*, *Journal of chemical technology and biotechnology (Oxford, Oxfordshire 1986)*, 71 (2), 95–110, DOI: 10.1002/(SICI)1097-4660(199802)71:2<95:AID-JCTB823>3.0.CO;2-J
- [Charcosset 2006] Charcosset, C. (2006): *Membrane processes in biotechnology*, *Biotechnology Advances*, 24 (5), 482–492, DOI: 10.1016/j.biotechadv.2006.03.002
- [Chemat 2015] Chemat, Farid; Strube, Jochen (2015): *Green extraction of natural products, Theory and practice*, WILEY-VCH, Weinheim
- [Chen 1989] Chen, T.-W., Pinto, N. G., van Brocklin, L. (1989): *Rapid method for determining multicomponent Langmuir parameters for displacement chromatography*, *Journal of chromatography A*, 484, 167–185, DOI: 10.1016/S0021-9673(01)88967-6
- [Chen 2006] Chen, W.-D., Hu, H.-H., Wang, Y.-D. (2006): *Analysis of steric mass-action model for protein adsorption equilibrium onto porous anion-exchange adsorbent*, *Chemical Engineering Science*, 61 (21), 7068–7076, DOI: 10.1016/j.ces.2006.07.036
- [Chmiel 2011] Chmiel, Horst (2011): *Bioprozesstechnik*. 3., neu bearb. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- [ChromaCon AG] ChromaCon AG: *The MCSGP process principle and Contichrom® equipment*
- [Chung 1968] Chung, S. F., Wen, C. Y. (1968): *Longitudinal dispersion of liquid flowing through fixed and fluidized beds*, *AIChE Journal*, 14 (857–866), DOI:
- Continuous sorption process employing fixed bed of sorbent and moving inlets and outlets*, Google Patents **1961**

- [Cramer 2011] Cramer, S. M., Holstein, M. A. (2011): *Downstream bioprocessing: recent advances and future promise*, *Current Opinion in Chemical Engineering*, 1, 27–37, DOI: 10.1016/j.coche.2011.08.008
- [Danckwerts 1953] Danckwerts, P. V. (1953): *Continuous flow systems. Distribution of residence times*, *Chemical Engineering Science*, 2, 1–13, DOI: 10.1016/0009-2509(96)81810-0
- [Deckert 1994] Deckert, P., Arlt, W. (1994): *Simulierte Gegenstromchromatographie*, *Chemie Ingenieur Technik*, 66 (10), 1334–1340, DOI:
- [Degerman 2008] Degerman, M., Jakobsson, N., Nilsson, B. (2008): *Designing Robust Preparative Purification Processes with High Performance*, *Chem. Eng. Technol.*, 31 (6), 875–882, DOI: 10.1002/ceat.200800097
- [DePhillips 2000] DePhillips, P., Lenhoff, A. M. (2000): *Pore size distributions of cation-exchange adsorbents determined by inverse size-exclusion chromatography*, *Journal of chromatography A*, 883, 39–54, DOI: 10.1016/S0021-9673(00)00420-9
- [Desta 2013] Desta, M. B. (2013): *Batch Sorption Experiments*, *Journal of Thermodynamics*, 2013 (1), 1–6, DOI: 10.1155/2013/375830
- [Determann 1969] Determann (1969): *Gel Chromatography, Gel Filtration · Gel Permeation · Molecular Sieves A Laboratory Handbook*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg
- [DeVault 1943] DeVault, D. (1943): *The Theory of Chromatography*, *J. Am. Chem. Soc.*, 65 (4), 532–540, DOI: 10.1021/ja01244a011
- [Dismer 2013] Dismer, F., Hansen, S., Oelmeier, S. A., Hubbuch, J. (2013): *Accurate retention time determination of co-eluting proteins in analytical chromatography by means of spectral data*, *Biotechnology and Bioengineering*, 110 (3), 683–693, DOI: 10.1002/bit.24738
- [Dose 2002] Dose, E. V., Jacobson, S., Guiochon, G. (2002): *Determination of isotherms from chromatographic peak shapes*, *Anal. Chem.*, 63 (8), 833–839, DOI: 10.1021/ac00008a020
- [Dwivedi 1977] Dwivedi, P. N., Upadhyay, S. N. (1977): *Particle-Fluid Mass Transfer in Fixed and Fluidized Beds*, *Ind. Eng. Chem. Proc. Des. Dev.*, 16 (2), 157–165, DOI: 10.1021/i260062a001
- [Eggersgluß 2012] Eggersgluß, J., Wellsandt, T., Strube, J. (2012): *Modell- und Miniplant-basierte Prozessentwicklung einer Proteinaufreinigung über wässrige Zweiphasenextraktion*, *Chemie Ingenieur Technik*, 84 (8), 1335–1336, DOI: 10.1002/cite.201250143
- [Engelhardt 1986] Engelhardt, Heinz; Aitzetmüller, K; Asshauer, J. (1986): *Practice of high performance liquid chromatography, Applications, equipment and quantitative analysis*, Springer, Berlin

- [Fahrner 1999] Fahrner, R. L., Blank, G. S. (1999): *Real-time control of antibody loading during protein A affinity chromatography using an on-line assay*, *Journal of chromatography A*, 849 (1), 191–196, DOI: 10.1016/S0021-9673(99)00539-7
- [Faria 2015] Faria, R. P. V., Rodrigues, A. E. (2015): *Instrumental aspects of Simulated Moving Bed chromatography*, *Journal of chromatography. A*, 1421, 82–102, DOI: 10.1016/j.chroma.2015.08.045
- [FDA 2003] FDA (2003): *Guidance for Industry, Biotechnology Law Report*, 23 (1), 68–86, DOI: 10.1089/073003104322838303
- [Felsing 2003] Felsing, A., Cavazzini, A., Guiochon, G. (2003): *Numerical determination of the competitive isotherm of enantiomers*, *Journal of chromatography A*, 986 (2), 207–225, DOI: 10.1016/S0021-9673(02)01919-2
- [FirstWorld Pharma 2016] King, S.: *FirstWorld Lists: The 100 best selling pharmaceutical brands* <<https://www.firstwordpharma.com/node/1375342>
- [Forrer 2008] Forrer, N. (2008): *Antibody Purification With Ion-Exchange Chromatography. Dissertation*, Eidgenössische Technische Hochschule
- [Francis 2011] Francis, P., Lieres, E. von, Haynes, C. A. (2011): *Zonal rate model for stacked membrane chromatography. I*, *Journal of chromatography. A*, 1218 (31), 5071–5078, DOI: 10.1016/j.chroma.2011.05.017
- [Francis 2012] Francis, P., Lieres, E. von, Haynes, C. (2012): *Zonal rate model for stacked membrane chromatography part II*, *Biotechnology and Bioengineering*, 109 (3), 615–629, DOI: 10.1002/bit.24349
- [Fritz 2008] Fritz (2008): *Ion Chromatography*, 3.Aufl., WILEY-VCH, Hoboken
- [Fröhlich 2012] Fröhlich, H., Villian, L., Melzner, D., Strube, J. (2012): *Membrane Technology in Bioprocess Science*, *Chemie Ingenieur Technik*, 297 (4), n/a-n/a, DOI: 10.1002/cite.201200025
- [Gauci 2008] Gauci, S., van Breukelen, B., Lemeer, S. M., Krijgsveld, J., Heck, A. J. R. (2008): *A versatile peptide pI calculator for phosphorylated and N-terminal acetylated peptides experimentally tested using peptide isoelectric focusing*, *Proteomics*, 8 (23-24), 4898–4906, DOI: 10.1002/pmic.200800295
- [Gerogiorgis 2015] Gerogiorgis, D., Jolliffe, H. G. (2015): *Continuous pharmaceutical process engineering and economics*, *Chemistry Today*, 33 (6), 29–32, DOI:
- [Gey 2008] Gey (2008): *Instrumentelle Analytik und Bioanalytik, Biosubstanzen, Trennmethode, Strukturanalytik, Applikationen*, 2.Aufl., Springer-Lehrbuch, Springer, Berlin, Heidelberg

- [Ghosh 2002] Ghosh, R. (2002): *Protein separation using membrane chromatography*, *Journal of chromatography A*, 952 (1–2), 13–27, DOI: 10.1016/S0021-9673(02)00057-2
- [Ghosh 2013] Ghosh, P., Vahedipour, K., Lin, M., Vogel, J. H., Haynes, C. A., Lieres, E. von (2013): *Zonal rate model for axial and radial flow membrane chromatography. Part I: knowledge transfer across operating conditions and scales*, *Biotechnology and Bioengineering*, 110 (4), 1129–1141, DOI: 10.1002/bit.24771
- [Ghosh 2014] Ghosh, P., Lin, M., Vogel, J. H., Choy, D., Haynes, C., Lieres, E. von (2014): *Zonal rate model for axial and radial flow membrane chromatography, part II*, *Biotechnology and Bioengineering*, 111 (8), 1587–1594, DOI: 10.1002/bit.25217
- [Gjoka 2015] Gjoka, X., Rogler, K., Martino, R. A., Gantier, R., Schofield, M. (2015): *A straightforward methodology for designing continuous monoclonal antibody capture multi-column chromatography processes*, *Journal of chromatography. A*, 1416, 38–46, DOI: 10.1016/j.chroma.2015.09.005
- [Godawat 2012] Godawat, R., Brower, K., Jain, S., Konstantinov, K., Riske, F., Warikoo, V. (2012): *Periodic counter-current chromatography -- design and operational considerations for integrated and continuous purification of proteins*, *Biotechnology Journal*, 7 (12), 1496–1508, DOI: 10.1002/biot.201200068
- [Golshan-Shirazi 1988] Golshan-Shirazi, S., Guiochon, G. (1988): *Analytical solution for the ideal model of chromatography in the case of a Langmuir isotherm*, *Anal. Chem.*, 60 (21), 2364–2374, DOI: 10.1021/ac00172a010
- [Golshan-Shirazi 1992] Golshan-Shirazi, S., Guiochon, G., in *Theoretical Advancement in Chromatography and Related Separation Techniques* (Eds: F. Dondi, G. Guiochon), Springer Netherlands. Dordrecht **1992**
- [Golshan-Shirazi 1994] Golshan-Shirazi, S., Guiochon, G. (1994): *Modeling of preparative liquid chromatography*, *Journal of chromatography A*, 658 (2), 149–171, DOI: 10.1016/0021-9673(94)80013-8
- [Gosling 2013] Gosling (2013): *The Java language specification, Java SE 7 edition*, 7. Aufl., Addison-Wesley, Upper Saddle River, NJ
- [Goto 2000] Goto, M., McCoy, B. J. (2000): *Inverse size-exclusion chromatography for distributed pore and solute sizes*, *Chemical Engineering Science*, 55 (4), 723–732, DOI: 10.1016/S0009-2509(99)00352-8
- [Grilo 2017] Grilo, A. L., Mateus, M., Aires-Barros, M. R., Azevedo, A. M. (2017): *Monoclonal antibodies production platforms: an opportunity study of a non protein A chromatographic platform based on process economics*, *Biotechnology Journal*, DOI: 10.1002/biot.201700260

- [Gronemeyer 2015] Gronemeyer, P., Strube, J. (2015): *Purification of Antibodies and their Fragments by ATPE and Precipitation*, *Chemie Ingenieur Technik*, 87 (8), 1057–1058, DOI: 10.1002/cite.201550107
- [Gronemeyer 2017] Gronemeyer, P., Strube, J. (2017): *Entwicklung einer Methode zur Integration von Upstream und Downstream Processing am Beispiel der Herstellung monoklonaler Antikörper*. Dissertation, Technische Universität Clausthal; Shaker Verlag GmbH
- [Großhans 2018] Großhans, S., Rüdts, M., Sanden, A., Brestrich, N., Morgenstern, J., Heissler, S., Hubbuch, J. (2018): *In-line Fourier-transform infrared spectroscopy as a versatile process analytical technology for preparative protein chromatography*, *Journal of chromatography. A*, DOI: 10.1016/j.chroma.2018.03.005
- [Gu 2015] Gu (2015): *Mathematical Modeling and Scale-Up of Liquid Chromatography*, Springer International Publishing, Cham
- [FDA 2004] (2004): *Guidance for Industry PAT — A Framework for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing, and Quality Assurance*
- [Guiochon 2006] Guiochon (2006): *Fundamentals of Preparative and Nonlinear Chromatography*, 2.Aufl., Elsevier Academic Press
- [Günzler 2010] Günzler, Helmut; Williams, Alex (2010): *Handbook of analytical techniques*, WILEY-VCH, Weinheim, New York
- [Hage 2006] Hage, David S. (2006): *Handbook of affinity chromatography*. 2. ed., Chromatographic science series, Vol. 92, Taylor & Francis/CRC Press, Boca Raton, Fla.
- [Hahn 2003] Hahn, R., Deinhofer, K., Machold, C., Jungbauer, A. (2003): *Hydrophobic interaction chromatography of proteins*, *Journal of chromatography B*, 790 (1-2), 99–114, DOI: 10.1016/S1570-0232(03)00080-1
- [Hahn 2015] Hahn, T., Huuk, T., Heuveline, V., Hubbuch, J. (2015): *Simulating and Optimizing Preparative Protein Chromatography with ChromX*, *J. Chem. Educ.*, 92 (9), 1497–1502, DOI: 10.1021/ed500854a
- [Hammerschmidt 2014] Hammerschmidt, N., Tscheliessnig, A., Sommer, R., Helk, B., Jungbauer, A. (2014): *Economics of recombinant antibody production processes at various scales: Industry-standard compared to continuous precipitation*, *Biotechnology Journal*, 9 (6), 766–775, DOI: 10.1002/biot.201300480
- [Hansen 2011] Hansen, S. K., Skibsted, E., Staby, A., Hubbuch, J. (2011): *A label-free methodology for selective protein quantification by means of absorption measurements*, *Biotechnology and Bioengineering*, 108 (11), 2661–2669, DOI: 10.1002/bit.23229
- [Hansen 2013] Hansen, S. K., Jamali, B., Hubbuch, J. (2013): *Selective high throughput protein quantification based on UV absorption spectra*, *Biotechnology and Bioengineering*, 110 (2), 448–460, DOI: 10.1002/bit.24712

- [Helfferich 1964] Helfferich, F. (1964): *Travel of molecules and disturbances in chromatographic columns*, *J. Chem. Educ.*, 41 (8), 410, DOI: 10.1021/ed041p410
- [Helfferich 1991] Helfferich, F. G. (1991): *The h- and ω -transformations in multicomponent fixed-bed ion exchange and adsorption*, *Chemical Engineering Science*, 46 (12), 3320–3323, DOI: 10.1016/0009-2509(91)85039-Z
- [Helfferich 1993] Helfferich, F. G., Carr, P. W. (1993): *Non-linear waves in chromatography*, *Journal of chromatography A*, 629 (2), 97–122, DOI: 10.1016/0021-9673(93)87026-I
- [Helfferich 1996] Helfferich, F. G., Whitley, R. D. (1996): *Non-linear waves in chromatography II. Wave interference and coherence in multicomponent systems*, *Journal of chromatography A*, 734 (1), 7–47, DOI: 10.1016/0021-9673(95)01067-X
- [Helling 2012] Helling, C., Borrmann, C., Strube, J. (2012): *Optimal Integration of Directly Combined Hydrophobic Interaction and Ion Exchange Chromatography Purification Processes*, *Chem. Eng. Technol.*, 35 (10), 1786–1796, DOI: 10.1002/ceat.201200043
- [Helling 2013] Helling, C., Dams, Gerwat, B., Belousov, A., Strube, J. (2013): *Physical characterization of column chromatography: stringent control over equipment performance in biopharmaceutical production*, *Trends in Chromatography*, 2013 (8), 55–71, DOI:
- [Henke 1999] Henke (1999): *Flüssig-Chromatographie, Analytische und präparative Trennungen*, 1.Aufl., LaborPraxis, Vogel, Würzburg
- [Hester 2015] Hester, Ronald Ernest; Harrison, Roy M. (2015): *Pharmaceuticals in the Environment*, Issues in environmental science and technology, Vol. 41, National Book Network International, Place of publication not identified
- [Hoffmann-Ostenhof 1978] Hoffmann-Ostenhof (1978): *Affinity Chromatography, Biospecific Sorption - The First Extensive Compendium on Affinity Chromatography as Applied to Biochemistry and Immunochemistry*, Elsevier Science, Burlington
- [Hofmeister 1888] Hofmeister, F. (1888): *Zur Lehre von der Wirkung der Salze*, *Archiv f. experiment. Pathol. u. Pharmacol*, 24 (4-5), 247–260, DOI: 10.1007/BF01918191
- [Holzer 2008] Holzer, M., Osuna-Sanchez, H., David, L. (2008): *Multicolumn Chromatography*, *BioProcess International*, 6 (8), 74–82, DOI:
- [Hünenberger 2011] Hünenberger (2011): *Single-ion solvation, Experimental and theoretical approaches to elusive thermodynamic quantities*, RSC theoretical and computational chemistry series, Vol. 3, RSC Publ, Cambridge
- [Huuk 2017] Huuk, T. C., Hahn, T., Doninger, K., Griesbach, J., Hepbildikler, S., Hubbuch, J. (2017): *Modeling of complex antibody elution behavior*

- under high protein load densities in ion exchange chromatography using an asymmetric activity coefficient, Biotechnology Journal, 12 (3), DOI: 10.1002/biot.201600336*
- [Iyer 1999] Iyer, H., Tapper, S., Lester, P., Wolk, B., van Reis, R. (1999): *Use of the steric mass action model in ion-exchange chromatographic process development, Journal of chromatography A, 832 (1-2), 1–9, DOI: 10.1016/S0021-9673(98)01002-4*
- [Jacobson 1987] Jacobson, J. M., Frenz, J. H., Horvath, C. G. (1987): *Measurement of competitive adsorption isotherms by frontal chromatography, Ind. Eng. Chem. Res., 26 (1), 43–50, DOI: 10.1021/ie00061a009*
- [Jen 1992] Jen, S.C.D., Pinto, N. G. (1992): *Theory of optimization of ideal displacement chromatography of binary mixtures, Journal of chromatography A, 590 (1), 3–15, DOI: 10.1016/0021-9673(92)87002-P*
- [Jen 1994] Jen, S.C.D., Pinto, N. G. (1994): *Modification of the h-root method for the determination of multicomponent Langmuir coefficients in liquid chromatography, Journal of chromatography A, 662 (2), 396–400, DOI: 10.1016/0021-9673(94)80527-X*
- [Jennings 1997] Jennings (1997): *Analytical gas chromatography, 2.Aufl., Academic Press, San Diego*
- [Jong 1993] Jong, S. de (1993): *SIMPLS, Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 18 (3), 251–263, DOI: 10.1016/0169-7439(93)85002-X*
- [Jönsson 1987] Jönsson, J. Å., Lökvist, P. (1987): *Determination of adsorption isotherms from chromatographic measurements, using the peak maxima method, Journal of chromatography A, 408, 1–7, DOI: 10.1016/S0021-9673(01)81785-4*
- [Jornitz 2012] Jornitz, M. W., Szarafinski, D., Peuker, T., in *Biopharmaceutical Production Technology, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA 2012*
- [Jungbauer 2005] Jungbauer, A., Machold, C., Hahn, R. (2005): *Hydrophobic interaction chromatography of proteins, Journal of chromatography A, 1079 (1-2), 221–228, DOI: 10.1016/j.chroma.2005.04.002*
- [Juza 1999] Juza, M. (1999): *Development of an high-performance liquid chromatographic simulated moving bed separation from an industrial perspective, Journal of chromatography A, 865, 35–49, DOI: 10.1016/S0021-9673(99)00982-6*
- [Kaczmariski 2002] Kaczmariski, K., Cavazzini, A., Szabelski, P., Zhou, D., Liu, X., Guiochon, G. (2002): *Application of the general rate model and the generalized Maxwell–Stefan equation to the study of the mass transfer kinetics of a pair of enantiomers, Journal of chromatography A, 962 (1–2), 57–67, DOI: 10.1016/S0021-9673(02)00585-X*

- [Kaltenbrunner 2012] Kaltenbrunner, O., Lu, Y., Sharma, A., Lawson, K., Tressel, T. (2012): *Risk-benefit evaluation of on-line high-performance liquid chromatography analysis for pooling decisions in large-scale chromatography*, *Journal of chromatography. A*, 1241, 37–45, DOI: 10.1016/j.chroma.2012.04.003
- [Kapoor 1989] Kapoor, A., Yang, R. T., Wong, C. (1989): *Surface Diffusion*, *Catalysis Reviews*, 31 (1-2), 129–214, DOI: 10.1080/01614948909351350
- [Kaspereit 2007] Kaspereit, M., Seidel-Morgenstern, A., Kienle, A. (2007): *Design of simulated moving bed processes under reduced purity requirements*, *Journal of chromatography. A*, 1162 (1), 2–13, DOI: 10.1016/j.chroma.2007.02.063
- [Keil 2010] Keil, Frerich (2010): *Modeling of process intensification*, WILEY-VCH, Weinheim, Chichester
- [Kempe 2006] Kempe, H., Persson, P., Axelsson, A., Nilsson, B., Zacchi, G. (2006): *Determination of diffusion coefficients of proteins in stationary phases by frontal chromatography*, *Biotechnology and Bioengineering*, 93 (4), 656–664, DOI: 10.1002/bit.20738
- [Khawli 2010] Khawli, L. A., Goswami, S., Hutchinson, R., Kwong, Z. W., Yang, J., Wang, X., Yao, Z., Sreedhara, A., Cano, T., Tesar, D., Nijem, I., Allison, D. E., Wong, P. Y., Kao, Y.-H., Quan, C., Joshi, A., Harris, R. J., Motchnik, P. (2010): *Charge variants in IgG1: Isolation, characterization, in vitro binding properties and pharmacokinetics in rats*, *mAbs*, 2 (6), 613–624, DOI: 10.4161/mabs.2.6.13333
- [Kiwala 2016] Kiwala, D., Mendrella, J., Antos, D., Seidel-Morgenstern, A. (2016): *Center-cut separation of intermediately adsorbing target component by 8-zone simulated moving bed chromatography with internal recycle*, *Journal of chromatography. A*, 1453, 19–33, DOI: 10.1016/j.chroma.2016.04.083
- [Knauer 2007] Knauer (2007): *Smartline UV Detector 2600 Manual / Handbuch*
- [Kong 2005] Kong, H., Ye, F., Lu, X., Guo, L., Tian, J., Xu, G. (2005): *Deconvolution of overlapped peaks based on the exponentially modified Gaussian model in comprehensive two-dimensional gas chromatography*, *Journal of chromatography A*, 1086, 160–164, DOI: 10.1016/j.chroma.2005.05.103
- [Konstantinov 2006] Konstantinov, K., Goudar, C., Ng, M., Meneses, R., Thrift, J., Chuppa, S., Matanguihan, C., Michaels, J., Naveh, D. (2006): *The "push-to-low" approach for optimization of high-density perfusion cultures of animal cells*, *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, 101, 75–98, DOI:
- [Kornecki 2018] Kornecki, M., Strube, J. (2018): *Process Analytical Technology for Advanced Process Control in Biologics Manufacturing with the Aid of Macroscopic Kinetic Modeling*, *Bioengineering*, 5 (1), DOI: 10.3390/bioengineering5010025

- [Krättli 2011] Krättli, M., Ströhlein, G., Aumann, L., Müller-Späth, T., Morbidelli, M. (2011): *Closed loop control of the multi-column solvent gradient purification process*, *Journal of chromatography A*, 1218 (50), 9028–9036, DOI: 10.1016/j.chroma.2011.09.081
- [Krättli 2013] Krättli, M., Steinebach, F., Morbidelli, M. (2013): *Online control of the twin-column countercurrent solvent gradient process for biochromatography*, *Journal of chromatography A*, 1293, 51–59, DOI: 10.1016/j.chroma.2013.03.069
- [Ladd Effio 2016] Ladd Effio, C., Hahn, T., Seiler, J., Oelmeier, S. A., Asen, I., Silberer, C., Villain, L., Hubbuch, J. (2016): *Modeling and simulation of anion-exchange membrane chromatography for purification of Sf9 insect cell-derived virus-like particles*, *Journal of chromatography. A*, 1429, 142–154, DOI: 10.1016/j.chroma.2015.12.006
- [Ladisch 2005] Ladisch, M. R., in *Van Nostrand's Scientific Encyclopedia*, John Wiley & Sons, Inc **2005**
- [Lan 2001] Lan, Q., Bassi, A. S., Zhu, J.-X., Margaritis, A. (2001): *A modified Langmuir model for the prediction of the effects of ionic strength on the equilibrium characteristics of protein adsorption onto ion exchange/affinity adsorbents*, *Chemical Engineering Journal*, 81 (1-3), 179–186, DOI: 10.1016/S1385-8947(00)00197-2
- [Langmuir 1918] Langmuir, I. (1918): *THE ADSORPTION OF GASES ON PLANE SURFACES OF GLASS, MICA AND PLATINUM*, *J. Am. Chem. Soc.*, 40 (9), 1361–1403, DOI: 10.1021/ja02242a004
- [Lapizco-Encinas 2005] Lapizco-Encinas, B. H., Pinto, N. G. (2005): *Determination of adsorption isotherms of proteins by H-root method*, *Journal of chromatography A*, 1070 (1-2), 201–205, DOI: 10.1016/j.chroma.2005.02.032
- [Larroche 2016] Larroche, Christian; Sanromán, María Ángeles; Du, Guocheng; Pandey, Ashok (2016): *Current developments in biotechnology and bioengineering, Bioprocesses, bioreactors and controls*, Elsevier, Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo
- [Lawson 1995] Lawson (1995): *Solving Least Squares Problems*, Society for Industrial and Applied Mathematics
- [Levenspiel 1999] Levenspiel (1999): *Chemical reaction engineering*, 3.Aufl., Wiley, New York
- [Liberti 1983] Liberti, Lorenzo; HELFFERICH, FRIEDRICH G. (1983): *Mass Transfer and Kinetics of Ion Exchange*, NATO ASI Series, Series E, Vol. 71, Springer, Dordrecht
- [Luyben 1990] Luyben (1990): *Process modelling, simulation, and control for chemical engineers*, 2.Aufl., McGraw-Hill chemical engineering series, McGraw-Hill, Boston Mass. u.a.

- [Ma 1996] Ma, Z., Whitley, R. D., Wang, N.-H. L. (1996): *Pore and surface diffusion in multicomponent adsorption and liquid chromatography systems*, *AIChE Journal*, 42 (5), 1244–1262, DOI: 10.1002/aic.690420507
- [Mazzotti 1994] Mazzotti, M., Storti, G., Morbidelli, M. (1994): *Robust design of countercurrent adsorption separation processes: 2. Multicomponent systems*, *AIChE Journal*, 40 (11), 1825–1842, DOI:
- [Mazzotti 1996] Mazzotti, M., Storti, G., Morbidelli, M. (1996): *Robust design of countercurrent adsorption separation: 3. Nonstoichiometric systems*, *AIChE Journal*, 42 (10), 2784–2796, DOI:
- [Mazzotti 1997a] Mazzotti, M., Storti, G., Morbidelli, M. (1997): *Optimal operation of simulated moving bed units for nonlinear chromatographic separations*, *Journal of chromatography A*, 769, 3–24, DOI: 10.1016/S0021-9673(97)00048-4
- [Mazzotti 1997b] Mazzotti, M., Storti, G., Morbidelli, M. (1997): *Robust design of countercurrent adsorption separation processes: 4. Desorbent in the feed*, *AIChE Journal*, 43 (1), 64–72, DOI:
- [Mazzotti 2006] Mazzotti, M. (2006): *Equilibrium theory based design of simulated moving bed processes for a generalized Langmuir isotherm*, *Journal of chromatography. A*, 1126 (1-2), 311–322, DOI: 10.1016/j.chroma.2006.06.022
- [McCoy 1996] McCoy, M., Kalghatgi, K., Regnier, F. E., Afeyan, N. (1996): *Perfusion chromatography — characterization of column packings for chromatography of proteins*, *Journal of chromatography A*, 743 (1), 221–229, DOI: 10.1016/0021-9673(96)00371-8
- [Mehay 2014] Mehay, A., Gu, T. (2014): *A General Rate Model of Ion-Exchange Chromatography for Investigating Ion-Exchange Behavior and Scale-up*, *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, 6 (4), 216–222, DOI: 10.4172/1948-5948.1000147
- [Melander 1977] Melander, W., Horváth, C. (1977): *Salt effects on hydrophobic interactions in precipitation and chromatography of proteins*, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 183 (1), 200–215, DOI: 10.1016/0003-9861(77)90434-9
- [Miglierini 2000] Miglierini, C., Mazzotti, M., Morbidelli, M. (2000): *Robust design of countercurrent adsorption separation processes: 5. Nonconstant selectivity*, *AIChE Journal*, 46 (7), 1384–1399, DOI:
- [Mihlbachler 2002] Mihlbachler, K., Kaczmarek, K., Seidel-Morgenstern, A., Guiochon, G. (2002): *Measurement and modeling of the equilibrium behavior of the Tröger's base enantiomers on an amylose-based chiral stationary phase*, *Journal of chromatography A*, 955 (1), 35–52, DOI: 10.1016/S0021-9673(02)00228-5

- [Miyabe 2007] Miyabe, K. (2007): *Surface diffusion in reversed-phase liquid chromatography using silica gel stationary phases of different C1 and C18 ligand densities*, *Journal of chromatography A*, 1167 (2), 161–170, DOI: 10.1016/j.chroma.2007.08.045
- [Morbidelli 1982] Morbidelli, M., Servida, A., Storti, G., Carra, S. (1982): *Simulation of multicomponent adsorption beds. Model analysis and numerical solution*, *Ind. Eng. Chem. Fund.*, 21 (2), 123–131, DOI: 10.1021/i100006a005
- [Mota 2005] Mota, J. P. B., Araújo, João M. M. (2005): *Single-column simulated-moving-bed process with recycle lag*, *AIChE Journal*, 51 (6), 1641–1653, DOI: 10.1002/aic.10426
- [Müller-Späth 2010] Müller-Späth, T., Aumann, L., Ströhlein, G., Kornmann, H., Valax, P., Delegrange, L., Charbaut, E., Baer, G., Lamproye, A., Jöhnck, M., Schulte, M., Morbidelli, M. (2010): *Two step capture and purification of IgG2 using multicolumn countercurrent solvent gradient purification (MCSGP)*, *Biotechnology and Bioengineering*, 107 (6), 974–984, DOI: 10.1002/bit.22887
- [Müller-Späth 2014] Müller-Späth (2014): *Counter-current chromatography for therapeutic protein purification*
- [Muralidharan 1997] Muralidharan, P. K., Ching, C. B. (1997): *Determination of Multicomponent Adsorption Equilibria by Liquid Chromatography*, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 36 (2), 407–413, DOI: 10.1021/ie9604278
- [Nasr 2017] Nasr, M. M., Krumme, M., Matsuda, Y., Trout, B. L., Badman, C., Mascia, S., Cooney, C. L., Jensen, K. D., Florence, A., Johnston, C., Konstantinov, K., Lee, S. L. (2017): *Regulatory Perspectives on Continuous Pharmaceutical Manufacturing: Moving From Theory to Practice: September 26-27, 2016, International Symposium on the Continuous Manufacturing of Pharmaceuticals*, *Journal of pharmaceutical sciences*, DOI: 10.1016/j.xphs.2017.06.015
- [Nfor 2010] Nfor, B. K., Noverraz, M., Chilamkurthi, S., Verhaert, P. D. E. M., van der Wielen, L. A. M., Ottens, M. (2010): *High-throughput isotherm determination and thermodynamic modeling of protein adsorption on mixed mode adsorbents*, *Journal of chromatography. A*, 1217 (44), 6829–6850, DOI: 10.1016/j.chroma.2010.07.069
- [Novasep] Novasep: *mAb Purification Case Study*, *BioSC - Sequential Multi-Column Chromatography*
- [Osberghaus 2012a] Osberghaus, A., Drechsel, K., Hansen, S., Hepbildikler, S. K., Nath, S., Haindl, M., Lieres, E. von, Hubbuch, J. (2012): *Model-integrated process development demonstrated on the optimization of a robotic cation exchange step*, *Chemical Engineering Science*, 76, 129–139, DOI: 10.1016/j.ces.2012.04.004
- [Osberghaus 2012b] Osberghaus, A., Hepbildikler, S., Nath, S., Haindl, M., Lieres, E. von, Hubbuch, J. (2012): *Optimizing a chromatographic three component separation: a comparison of mechanistic and empiric*

- modeling approaches, Journal of chromatography A*, 1237, 86–95, DOI: 10.1016/j.chroma.2012.03.029
- [Otto 2011] Otto (2011): *Analytische Chemie*, 4. Aufl., Bachelor, WILEY-VCH, Weinheim, Bergstr
- [Padmanabhan 2014] Padmanabhan (2014): *Handbook of pharmacogenomics and stratified medicine*, Academic Press, London
- [Pais 1998] Pais, L. S., Loureiro, J. M., Rodrigues, A. E. (1998): *Modeling strategies for enantiomers separation by SMB chromatography, AIChE J.*, 44 (3), 561–569, DOI: 10.1002/aic.690440307
- [Piątkowski 2003] Piątkowski, W., Antos, D., Kaczmarski, K. (2003): *Modeling of preparative chromatography processes with slow intraparticle mass transport kinetics, Journal of chromatography A*, 988 (2), 219–231, DOI: 10.1016/S0021-9673(02)02060-5
- [Pino 2015] Pino (2015): *Analytical Separation Science*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany
- [Pollock 2013] Pollock, J., Ho, S. V., Farid, S. S. (2013): *Fed-batch and perfusion culture processes: economic, environmental, and operational feasibility under uncertainty, Biotechnology and Bioengineering*, 110 (1), 206–219, DOI: 10.1002/bit.24608
- [Poole 2012] Poole, C. F. (2012): *Gas chromatography*. 1. ed., Elsevier, Amsterdam
- [Porterfield 2010] Porterfield, J. Z., Zlotnick, A. (2010): *A simple and general method for determining the protein and nucleic acid content of viruses by UV absorbance, Virology*, 407 (2), 281–288, DOI: 10.1016/j.virol.2010.08.015
- [Proll 2004] Proll, G., Kumpf, M., Mehlmann, M., Tschmelak, J., Griffith, H., Abuknesha, R., Gauglitz, G. (2004): *Monitoring an antibody affinity chromatography with a label-free optical biosensor technique, Journal of immunological methods*, 292 (1-2), 35–42, DOI: 10.1016/j.jim.2004.05.008
- [Puigjaner 2006] Puigjaner, Luis; Heyen, Georges (2006): *CAPE, Computer aided process and product engineering*, WILEY-VCH, Weinheim
- [Puthirasigamany 2014] Puthirasigamany, M., Hamm, I., van Winssen, F. A., Nikbin, N., Kreis, P., Gorak, A., Zeiner, T. (2014): *Purification of biomolecules combining ATPS and membrane chromatography, Food and Bioproducts Processing*, 92 (2), 152–160, DOI: 10.1016/j.fbp.2014.03.006
- [Queiroz 2001] Queiroz, J. A., Tomaz, C. T., Cabral, J.M.S. (2001): *Hydrophobic interaction chromatography of proteins, Journal of Biotechnology*, 87 (2), 143–159, DOI: 10.1016/S0168-1656(01)00237-1
- [Raghavan 1983] Raghavan, N. S., Ruthven, D. M. (1983): *Numerical simulation of a fixed-bed adsorption column by the method of orthogonal*

- collocation*, *AIChE J.*, 29 (6), 922–925, DOI: 10.1002/aic.690290608
- [Rajendran 2008] Rajendran, A. (2008): *Equilibrium theory-based design of simulated moving bed processes under reduced purity requirements linear isotherms*, *Journal of chromatography. A*, 1185 (2), 216–222, DOI: 10.1016/j.chroma.2008.01.054
- [Rakel 2013] Rakel, N., Schleining, K., Dimer, F., Hubbuch, J. (2013): *Self-interaction chromatography in pre-packed columns: a critical evaluation of self-interaction chromatography methodology to determine the second virial coefficient*, *Journal of chromatography A*, 1293, 75–84, DOI: 10.1016/j.chroma.2013.03.077
- [Rathore 2008] Rathore, A. S., Wood, R., Sharma, A., Dermawan, S. (2008): *Case study and application of process analytical technology (PAT) towards bioprocessing: II. Use of ultra-performance liquid chromatography (UPLC) for making real-time pooling decisions for process chromatography*, *Biotechnology and Bioengineering*, 101 (6), 1366–1374, DOI: 10.1002/bit.21982
- [Rathore 2010] Rathore, A. S., Parr, L., Dermawan, S., Lawson, K., Lu, Y. (2010): *Large scale demonstration of a process analytical technology application in bioprocessing: use of on-line high performance liquid chromatography for making real time pooling decisions for process chromatography*, *Biotechnology progress*, 26 (2), 448–457, DOI: 10.1002/btpr.320
- [Ravald 2001] Ravald, L., Fornstedt, T. (2001): *Theoretical study of the accuracy of the elution by characteristic points method for bi-Langmuir isotherms*, *Journal of chromatography A*, 908 (1-2), 111–130, DOI: 10.1016/S0021-9673(00)00965-1
- [Rhee 1971] Rhee, H.-K., Aris, R., Amundson, N. R. (1971): *Multicomponent Adsorption in Continuous Countercurrent Exchangers*, *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 269 (1194), 187–215, DOI: 10.1098/rsta.1971.0028
- [Ribeiro 2016] Ribeiro, R. (2016): *8-zone Simulated Moving Bed Chromatography for the separation of ternary mixtures*
- [Riley 2011] Riley, B. S., Li, X. (2011): *Quality by design and process analytical technology for sterile products--where are we now?*, *AAPS PharmSciTech*, 12 (1), 114–118, DOI: 10.1208/s12249-010-9566-x
- [Rodrigues 2015] Rodrigues (2015): *Simulated Moving Bed Technology, Principles, Design and Process Applications*, Elsevier Science, Burlington
- [Roper 1995] Roper, D.K., Lightfoot, E. N. (1995): *Estimating plate heights in stacked-membrane chromatography by flow reversal*, *Journal of chromatography A*, 702 (1-2), 69–80, DOI: 10.1016/0021-9673(94)01068-P

- [Rosen 1952] Rosen, J. B. (1952): *Kinetics of a Fixed Bed System for Solid Diffusion into Spherical Particles*, *The Journal of Chemical Physics*, 20 (3), 387–394, DOI: 10.1063/1.1700431
- [Rüdt 2017] Rüdt, M., Brestrich, N., Rolinger, L., Hubbuch, J. (2017): *Real-time monitoring and control of the load phase of a protein A capture step*, *Biotechnology and Bioengineering*, 114 (2), 368–373, DOI: 10.1002/bit.26078
- [Ruthven 1984] Ruthven (1984): *Principles of adsorption and adsorption processes*, A Wiley-Interscience publication, Wiley, New York
- [Ruthven 1989] Ruthven, D. M., Ching, C. B. (1989): *Counter-current and simulated counter-current adsorption separation processes*, *Chemical Engineering Science*, 44 (5), 1011–1038, DOI: 10.1016/0009-2509(89)87002-2
- [Samuelsson 2008] Samuelsson, J., Fornstedt, T. (2008): *Injection technique for generating accurate adsorption isotherm data using the elution by characteristic points method*, *Analytical chemistry*, 80 (20), 7887–7893, DOI: 10.1021/ac8010999
- [Samuelsson 2009] Samuelsson, J., Arnell, R., Fornstedt, T. (2009): *Potential of adsorption isotherm measurements for closer elucidating of binding in chiral liquid chromatographic phase systems*, *Journal of Separation Science*, 32 (10), 1491–1506, DOI: 10.1002/jssc.200900165
- [Santos da Silva 2016] Santos da Silva, F., Seidel-Morgenstern, A. (2016): *Evaluation of center-cut separations applying simulated moving bed chromatography with 8 zones*, *Journal of chromatography. A*, 1456, 123–136, DOI: 10.1016/j.chroma.2016.05.060
- [Sattler 2000] Sattler (2000): *Verfahrenstechnische Anlagen, Planung, Bau und Betrieb*
- [Sawyer 1984] Sawyer (1984): *Chemistry experiments for instrumental methods*, Wiley, New York
- [Saxena 2009] Saxena, A., Tripathi, B. P., Kumar, M., Shahi, V. K. (2009): *Membrane-based techniques for the separation and purification of proteins*, *Advances in Colloid and Interface Science*, 145 (1–2), 1–22, DOI: 10.1016/j.cis.2008.07.004
- [Schaber 2011] Schaber, S. D., Gerogiorgis, D. I., Ramachandran, R., Evans, J. M. B., Barton, P. I., Trout, B. L. (2011): *Economic Analysis of Integrated Continuous and Batch Pharmaceutical Manufacturing*, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 50 (17), 10083–10092, DOI: 10.1021/ie2006752
- [Schmidt-Traub 2006] Schmidt-Traub, Henner (2006): *Preparative chromatography of fine chemicals and pharmaceutical agents*. 1. ed., 1. reprint, WILEY-VCH, Weinheim

- [Schmidt-Traub 2012] Schmidt-Traub, H; Schulte, Michael; Seidel-Morgenstern, Andreas (2012): *Preparative chromatography*. 2., completely revised and updated ed., WILEY-VCH, Weinheim, Germany
- [Schwellenbach 2016] Schwellenbach, J., Zobel, S., Taft, F., Villain, L., Strube, J. (2016): *Purification of Monoclonal Antibodies Using a Fiber Based Cation-Exchange Stationary Phase*, *Bioengineering*, 3 (4), 24, DOI: 10.3390/bioengineering3040024
- [Schwellenbach 2017] Schwellenbach (2017): *Design, Charakterisierung und Prozessintegration nicht-partikulärer Medien für bio-chromatographische Trennaufgaben*, 1.Aufl., Thermische Verfahrens- und Prozesstechnik, Shaker, Herzogenrath
- [Scopes 1994] Scopes (1994): *Protein Purification, Principles and Practice*, Springer Advanced Texts in Chemistry, Springer, New York, NY
- [Seidel-Morgenstern 1995] Seidel-Morgenstern (1995): *Mathematische Modellierung der präparativen Flüssigchromatographie*, DUV Naturwissenschaft, DUV Dt. Univ.-Verl., Wiesbaden
- [Seidel-Morgenstern 2004] Seidel-Morgenstern, A. (2004): *Experimental determination of single solute and competitive adsorption isotherms*, *Journal of chromatography A*, 1037 (1–2), 255–272, DOI: 10.1016/j.chroma.2003.11.108
- [Shukla 2013] Shukla, A. A., Gottschalk, U. (2013): *Single-use disposable technologies for biopharmaceutical manufacturing*, *Trends in biotechnology*, 31 (3), 147–154, DOI: 10.1016/j.tibtech.2012.10.004
- [Sommerfeld 2005] Sommerfeld, S., Strube, J. (2005): *Challenges in biotechnology production—generic processes and process optimization for monoclonal antibodies*, *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 44 (10), 1123–1137, DOI: 10.1016/j.cep.2005.03.006
- [Song 2012] Song, S.-M., Park, M.-B., Kim, I. H. (2012): *Three-zone simulated moving-bed (SMB) for separation of cytosine and guanine*, *Korean J. Chem. Eng.*, 29 (7), 952–958, DOI: 10.1007/s11814-011-0247-6
- [Song 2013] Song, S.-M., Kim, I. H. (2013): *A three-zone simulated moving-bed for separation of immunoglobulin Y*, *Korean J. Chem. Eng.*, 30 (8), 1527–1532, DOI: 10.1007/s11814-013-0106-8
- [Stankiewicz 2015] Stankiewicz (2015): *Fundamentals of process intensification*, WILEY-VCH, [Place of publication not identified]
- [Steinebach 2016] Steinebach, F., Muller-Spath, T., Morbidelli, M. (2016): *Continuous counter-current chromatography for capture and polishing steps in biopharmaceutical production*, *Biotechnology Journal*, 11 (9), 1126–1141, DOI: 10.1002/biot.201500354
- [Storti 1989] Storti, G., Masi, M., Carrà, S., Morbidelli, M. (1989): *Optimal design of multicomponent countercurrent adsorption separation processes*

- involving nonlinear equilibria, Chemical Engineering Science, 44* (6), 1329–1345, DOI: 10.1016/0009-2509(89)85006-7
- [Storti 1993] Storti, G., Mazzotti, M., Morbidelli, M., Carrà, S. (1993): *Robust design of binary countercurrent adsorption separation processes, AIChE Journal, 39* (3), 471–492, DOI:
- [Storti 1995] Storti, G., Baciocchi, R., Mazzotti, M., Morbidelli, M. (1995): *Design of Optimal Operating Conditions of Simulated Moving Bed Adsorptive Separation Units, Ind. Eng. Chem. Res., 34*, 288–301, DOI:
- [Ströhlein 2006] Ströhlein, G., Aumann, L., Mazzotti, M., Morbidelli, M. (2006): *A continuous, counter-current multi-column chromatographic process incorporating modifier gradients for ternary separations, Journal of chromatography. A, 1126* (1-2), 338–346, DOI: 10.1016/j.chroma.2006.05.011
- [Strube 1996] Strube (1996): *Simulation und Optimierung kontinuierlicher Simulated-Moving-Bed (SMB)-Chromatographie-Prozesse*
- [Strube 1997] Strube, J., Altenhöner, U., Meurer, M., Schmidt-Traub, H., Schulte, M. (1997): *Dynamic simulation of simulated moving-bed chromatographic processes for the optimization of chiral separations, Journal of chromatography A, 769* (1), 81–92, DOI: 10.1016/S0021-9673(97)00236-7
- [Strube 2000] Strube (2000): *Technische Chromatographie: Auslegung, Optimierung, Betrieb und Wirtschaftlichkeit*, Berichte aus der Verfahrenstechnik, Shaker, Aachen
- [Strube 2011] Strube, J., Grote, F., Josch, J. P., Ditz, R. (2011): *Process Development and Design of Downstream Processes, Chemie Ingenieur Technik, 83* (7), 1044–1065, DOI: 10.1002/cite.201100017
- [Strube 2012] Strube, J., Grote, F., Ditz, R., in *Biopharmaceutical Production Technology*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA **2012**
- [Strube 2014] Strube, J., Ditz, R., Fröhlich, H., Köster, D., Grützner, T., Koch, J., Schütte, R. (2014): *Efficient Engineering and Production Concepts for Products in Regulated Environments - Dream or Nightmare?*, *Chemie Ingenieur Technik, 86* (5), 687–694, DOI: 10.1002/cite.201300081
- [Subramanian 2012] Subramanian, Ganapathy (2012): *Biopharmaceutical Production Technology*. 1. Aufl., WILEY-VCH, Weinheim
- [Subramanian 2015] Subramanian, G. (2015): *Continuous processing in pharmaceutical manufacturing*, WILEY-VCH, Weinheim
- [Subramanian 2017] Subramanian, Ganapathy (2017): *Continuous Biomanufacturing, Innovative Technologies and Methods*, WILEY-VCH, Weinheim

- [Taylor 1993] Taylor (1993): *Multicomponent mass transfer*, Wiley series in chemical engineering, Wiley, New York
- [Taylor 2015] Taylor, D., in *Pharmaceuticals in the Environment*, Issues in environmental science and technology, Vol. 41 (Eds: R. E. Hester, R. M. Harrison), National Book Network International. Place of publication not identified **2015**
- [Teeters 2009] Teeters, M., Benner, T., Bezila, D., Shen, H., Velayudhan, A., Alred, P. (2009): *Predictive chromatographic simulations for the optimization of recovery and aggregate clearance during the capture of monoclonal antibodies*, *Journal of chromatography. A*, 1216 (33), 6134–6140, DOI: 10.1016/j.chroma.2009.06.066
- [Thévenin 2008] Thévenin, Dominique; Janiga, Gábor (2008): *Optimization and Computational Fluid Dynamics*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg
- [Thomas 2013] Thomas, H., Coquebert de Neuville, Bertrand, Storti, G., Morbidelli, M., Joehnck, M., Schulte, M. (2013): *Role of tentacles and protein loading on pore accessibility and mass transfer in cation exchange materials for proteins*, *Journal of chromatography A*, 1285, 48–56, DOI: 10.1016/j.chroma.2013.01.104
- [Traylor 2014] Traylor, S. J., Bowes, B. D., Ammirati, A. P., Timmick, S. M., Lenhoff, A. M. (2014): *Fluorescence recovery after photobleaching investigation of protein transport and exchange in chromatographic media*, *Journal of chromatography. A*, 1340, 33–49, DOI: 10.1016/j.chroma.2014.02.072
- [Unger 1994] Unger (1994): *Handbuch der HPLC, Teil 2: Präparative Säulenflüssig-Chromatographie*, GIT Verlag GmbH, Darmstadt
- [Unger 1995] Unger (1995): *Handbuch der HPLC, Teil 1 - Leitfaden für Anfänger und Praktiker*, 2.Aufl., GIT Verlag GmbH, Darmstadt
- [Unger 2012] Unger, K. K., Liapis, A. I. (2012): *Adsorbents and columns in analytical high-performance liquid chromatography*, *J. Sep. Science*, 35 (10-11), 1201–1212, DOI: 10.1002/jssc.201200042
- [van Reis 2001] van Reis, R., Zydney, A. (2001): *Membrane separations in biotechnology*, *Current Opinion in Biotechnology*, 12 (2), 208–211, DOI: 10.1016/S0958-1669(00)00201-9
- [Vivó-Truyols 2005a] Vivó-Truyols, G., Torres-Lapasió, J. R., van Nederkassel, A M, Vander Heyden, Y., Massart, D. L. (2005): *Automatic program for peak detection and deconvolution of multi-overlapped chromatographic signals part I: peak detection*, *Journal of chromatography A*, 1096, 133–145, DOI: 10.1016/j.chroma.2005.03.092
- [Vivó-Truyols 2005b] Vivó-Truyols, G., Torres-Lapasió, J. R., van Nederkassel, A M, Vander Heyden, Y., Massart, D. L. (2005): *Automatic program for peak detection and deconvolution of multi-overlapped*

- chromatographic signals part II: peak model and deconvolution algorithms*, *Journal of chromatography A*, 1096, 146–155, DOI: 10.1016/j.chroma.2005.03.072
- [Warikoo 2012] Warikoo, V., Godawat, R., Brower, K., Jain, S., Cummings, D., Simons, E., Johnson, T., Walther, J., Yu, M., Wright, B., McLarty, J., Karey, K. P., Hwang, C., Zhou, W., Riske, F., Konstantinov, K. (2012): *Integrated continuous production of recombinant therapeutic proteins*, *Biotechnology and Bioengineering*, 109 (12), 3018–3029, DOI: 10.1002/bit.24584
- [Wedler 1985] Wedler (1985): *Lehrbuch der physikalischen Chemie*, 2.Aufl., VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim
- [Wehner 1956] Wehner, J. F., Wilhelm, R. H. (1956): *Boundary conditions of flow reactor*, *Chemical Engineering Science*, 6 (2), 89–93, DOI: 10.1016/0009-2509(56)80014-6
- [Weiss 2004] Weiss (2004): *Handbook of ion chromatography*, 3.Aufl., WILEY-VCH, Weinheim, Great Britain
- [Whitford 2010] Whitford, W. G. (2010): *Single-Use Systems As Principal Components in Bioproduction*, *BioProcess International*, 8 (11), 34–44, DOI:
- [Wicke 1939] Wicke, E. (1939): *Empirische und theoretische Untersuchungen der Sorptionsgeschwindigkeit von Gasen an porösen Stoffen II*, *Kolloid-Zeitschrift*, 86 (3), 295–313, DOI: 10.1007/BF01511392
- [Wiesel 2003] Wiesel, A., Schmidt-Traub, H., Lenz, J., Strube, J. (2003): *Modelling gradient elution of bioactive multicomponent systems in non-linear ion-exchange chromatography*, *Journal of chromatography A*, 1006 (1-2), 101–120, DOI: 10.1016/S0021-9673(03)00554-5
- [Williamson 1963] Williamson, J. E., Bazaire, K. E., Geankoplis, C. J. (1963): *Liquid-Phase Mass Transfer at Low Reynolds Numbers*, *Ind. Eng. Chem. Fund.*, 2 (2), 126–129, DOI: 10.1021/i160006a007
- [Wilson 1940] Wilson, J. N. (1940): *A Theory of Chromatography*, *J. Am. Chem. Soc.*, 62 (6), 1583–1591, DOI: 10.1021/ja01863a071
- [Wilson 1966] Wilson, E. J., Geankoplis, C. J. (1966): *Liquid Mass Transfer at Very Low Reynolds Numbers in Packed Beds*, *Ind. Eng. Chem. Fund.*, 5 (1), 9–14, DOI: 10.1021/i160017a002
- [Wold 1982] Wold, H., in *Systems under indirect observation causality, structure, prediction*, North-Holland Publ. Amsterdam, New York [u.a.] **1982**
- [Wold 2001] Wold, S., Sjöström, M., Eriksson, L. (2001): *PLS-regression, Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 58 (2), 109–130, DOI: 10.1016/S0169-7439(01)00155-1

- [Wu 1999] Wu, Chi-san (1999): *Column handbook for size exclusion chromatography*, Academic, San Diego, Calif, London
- [Yadav 2012] Yadav, S., Laue, T. M., Kalonia, D. S., Singh, S. N., Shire, S. J. (2012): *The influence of charge distribution on self-association and viscosity behavior of monoclonal antibody solutions*, *Molecular pharmaceuticals*, 9 (4), 791–802, DOI: 10.1021/mp200566k
- [Yamamoto 1988] Yamamoto (1988): *Ion exchange chromatography of proteins*, *Chromatographic science*, Vol. 43, Dekker, New York NY u.a.
- [Yavorsky 2012] Yavorsky (2012): *A New Disposable Technology for Chromatographic Purification of Biopharmaceuticals*, Darmstadt
- [Young 1980] Young, M. E., Carroad, P. A., Bell, R. L. (1980): *Estimation of diffusion coefficients of proteins*, *Biotechnology and Bioengineering*, 22 (5), 947–955, DOI: 10.1002/bit.260220504
- [Zachariou 2008] Zachariou, Michael (2008): *Affinity Chromatography, Methods and Protocols*. Second Edition, SpringerLink Bücher, Vol. 421, Humana Press, Totowa, NJ
- [Zhang 2017] Zhang, J., Conley, L., Pieracci, J., Ghose, S. (2017): *Pool-less processing to streamline downstream purification of monoclonal antibodies*, *Eng. Life Sci.*, 17 (2), 117–124, DOI: 10.1002/elsc.201600104
- [Zobel 2014] Zobel, S., Helling, C., Ditz, R., Strube, J. (2014): *Design and Operation of Continuous Countercurrent Chromatography in Biotechnological Production*, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 53 (22), 9169–9185, DOI: 10.1021/ie403103c
- [Zobel-Roos 2017] Zobel-Roos, S., Mouellef, M., Siemers, C., Strube, J. (2017): *Process Analytical Approach towards Quality Controlled Process Automation for the Downstream of Protein Mixtures by Inline Concentration Measurements Based on Ultraviolet/Visible Light (UV/VIS) Spectral Analysis*, *Antibodies*, 6 (4), 24, DOI: 10.3390/antib6040024
- [Zobel-Roos 2018] Zobel-Roos, S., Stein, D., Strube, J. (2018): *Evaluation of Continuous Membrane Chromatography Concepts with an Enhanced Process Simulation Approach*, *Antibodies*, 7 (1), 13, DOI: 10.3390/antib7010013
- [Zydney 2016] Zydney, A. L. (2016): *Continuous downstream processing for high value biological products: A Review*, *Biotechnology and Bioengineering*, 113 (3), 465–475, DOI: 10.1002/bit.25695

Steffen Zobel-Roos



Persönliche Daten	Familienstand:	verheiratet, keine Kinder
	Geburtstag, -ort:	05. Februar 1987, Quakenbrück
Beruflicher Werdegang	seit 01/13	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Thermische Verfahrens- und Prozesstechnik, TU Clausthal
Ausbildung	10/06 – 12/12	Hochschulstudium an der Technischen Universität Clausthal Diplomingenieur Verfahrenstechnik, Vertiefungsrichtung: Thermische Verfahrens- und Prozesstechnik, Bioverfahrenstechnik
	08/00 – 06/06	Artland Gymnasium Quakenbrück Schulabschluss: Abitur
Diplomarbeit	06/12 – 12/12	Institut für Thermische Verfahrens- und Prozesstechnik, TU Clausthal <i>Modellierung und Validierung eines axialen Dispersionsmodells für die Flüssig-Flüssig-Extraktion</i>
Studienarbeit	12/11 – 08/11	Institut für Thermische Verfahrens- und Prozesstechnik, TU Clausthal <i>Inbetriebnahme und Leistungscharakterisierung einer Miniplant Rektifikations- und Extraktionsanlage</i>